T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

Le grade de DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Emanuel SHECHTER

Première thèse

ACTIVITE OPTIQUE DES POLYPEPTIDES ET DES PROTEINES.
APPLICATIONS A LA DETERMINATION DES STRUCTURES SECONDAIRE ET TERTIAIRE

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le décembre 1967 devant la commission d'examen

MM.	H.	BENOIT	Président
	J.M.	LEHN	Examinateurs
	G.	WEILL	
	V.	LUZZATI	Invité

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552704_0027

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

Le grade de DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Emanuel SHECHTER

Première thèse

ACTIVITE OPTIQUE DES POLYPEPTIDES ET DES PROTEINES.
APPLICATIONS A LA DETERMINATION DES STRUCTURES SECONDAIRE ET TERTIAIRE

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le décembre 1967 devant la commission d'examen

MM.	H. BENOIT	Président
	J.M. LEHN	Examinateurs
	G. WEILL	
	V. LUZZATI	Invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE DES SCIENCES DE

L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Doyen: J.H. VIVIEN

Doyens Honoraires: A DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT.

Professeurs Honoraires: P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, Mle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférences Honoraires: R. WEILL.

Professeurs:

H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mle M. PEREY	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
Cl. LEVI	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAPLANG	T.	Physique
J.P. LONGCHAMP	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A. ROCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
A. SIGOT	P.S.C.	Zoologie

J. COGNE	T.T.P.	Géologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T.T.P.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL	T.	Chimie biologique
J. PARROD	T.T.P.	Chimie
R. WEY	T.T.P.	Chimie
Mme D. MAGNAC	T.T.P.	Physique
M. DAUNE	P.S.C.	Physique
J.P. ADLOFF	T.T.P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
M. ZISMAN	T.T.P.	Mathématiques
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	P.S.C.	Physique
J. GREMILLARD	T.T.T.	Máthématiques
P. CARTIER	T.	Mathématiques M.P.C.
G. REEB	T.	Topologie
F. NORGUET	T.	Analyse supérieure
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P.S.C.	Physique
Mme M. BRINI	P.S.C.	Chimie
G. PERNY	P.S.C.	Physique
R. BARO	P.S.C.	Physique
H. DURANTON	P.S.C.	Botanique
R. WEISS	T.T.P.	Chimie
P. FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J. LERAY	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING	P.S.C.	Chimie
M. SIESKIND	P.S.C.	Physique
G. MONSONEGO	P.S.C.	Physique mathématique
P. GABRIEL	T.T.P.	Mathématiques
C. WIPPLRR	T.	Physicochimie des Hauts Polymères Industriel
P.A. MEYER	T.T.P.	Mathématiques
G. WEILL	P.S.C.	Physique
J.M. BL CH	T.	Chimie
A. CLAUSS	P.S.C.	Chimie
R. OMNES	P.S.C.	Physique théorique
E. FOLLENIUS	P.S.C.	Zoologie
J. LUCAS	P.S.C.	Géologie

Professeurs associés:

S.R. DE GROOT	Physique nucléaire
K. VESELY	Physicochimie macromoléculaire

Maîtres de Conférences:

H. DANAN	Physique
Mme Chr. WINTER	Physique
J.P. EBERHART	Minéralogie
Mme D. GAGNIANT	Chimie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie

J. WEIL..... Chimie biologique
F. GAUTIER..... Physique propédeutique
G. SUTTER..... Physique électronique
D. FOATA..... Mathématiques
J.L. VERDIER..... Mathématiques
J.M. LEHN..... Chimie
Cl. ROBERT..... Physique

Maîtres de Conférences associés·

V. AVANISSIAN..... Mathématiques
R.A. MASSY WESTROPP..... Chimie organique
J. FUTAK..... Botanique

Secrétaire: G. SAINT-PE

A mes parents

A ma femme

à ma fille

A Monsieur Elkan R. BLOUT

A Monsieur Vittorio LUZZATI

Ce travail a été effectué de 1963 à 1967, d'une part aux Etats Unis (Harvard Medical School, Boston), d'autre part sous les auspices du Centre National de la Recherche Scientifique au laboratoire de Génétique Physiologique à Gif. Que Messieurs les professeurs E.R. Blout, directeur du laboratoire de Chimie Biologique à Boston, et P. Slonimski, directeur du laboratoire de Génétique Physiologique à Gif, qui m'ont accueilli avec bienveillance dans leur laboratoire trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Tout au long de ce travail, Monsieur le professeur E.R. Blout et Monsieur V. Luzzati, directeur de recherches au C.N.R.S., m'ont fait bénéficier de leur expérience et de leurs conseils. Leurs suggestions et critiques m'ont bien souvent été une aide précieuse et un encouragement. Je suis heureux de leur exprimer ma reconnaissance.

Comme il apparait des noms des auteurs des mémoires qui se trouvent en appendice, ce travail n'aurait pas été possible sans la collaboration étroite de Monsieur J.P. Carver et de Monsieur P. Saludjian, chargé de recherches au C.N.R.S. Je leur en exprime mes remerciements les plus sincères.

Je remercie également Monsieur le professeur G. Weill pour le temps qu'il a bien voulu consacrer à la correction de cette thèse.

Enfin, c'est pour moi un plaisir d'associer en une pensée amicale tous mes camarades, chercheurs et techniciens, qui ont contribué à la réussite de cette thèse.

Ce travail a bénéficié de l'aide du "Public Health Service" et de la "Délégation générale à la Recherche scientifique et technique"

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

ORIGINES ET THEORIES DE L'ACTIVITE OPTIQUE

Chapitre I. DECOUVERTE DE L'ACTIVITE OPTIQUE 2

Chapitre II. GRANDEURS MACROSCOPIQUES DE L'ACTIVITE OPTIQUE 4

Chapitre III. THEORIES DE L'ACTIVITE OPTIQUE 7

I) Théories classiques 7

a) modèle de Drude 8

b) modèle de Kuhn 8

II) Théories quantiques 9

a) théorie de la polarisabilité de Kirkwood 10

b) théorie du potentiel asymétrique 11

Chapitre IV. THEOREME DE KRONIG ET KRAMERS 12

ETUDE DE L'ACTIVITE OPTIQUE ASSOCIEE AUX CHROMOPHORES PEPTIDIQUES DES POLYPEPTIDES ET DES PROTEINES. DETERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE.

INTRODUCTION 15

Chapitre I. PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DES CHROMOPHORES PEPTIDIQUES ISOLES 17

I) Transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ 17

II) Transitions $n \rightarrow \pi^*$ 17

Chapitre II. PROPRIETES OPTIQUES DES AGREGATS DE CHROMOPHORES PEPTIDIQUES 18

I) Transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ 18

II) Transitions $n \rightarrow \pi^*$ 19

III) Prévisions concernant l'activité optique des polypeptides α hélicoïdaux .. 19

a) transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ 19

b) transition $n \rightarrow \pi^*$ 20

Chapitre III. ACTIVITE OPTIQUE DES POLYPEPTIDES ET DES PROTEINES DANS LE VISIBLE ET LE PROCHE ULTRA VIOLET 21

I) Rotation à la raie jaune du sodium 21

II) Equation de Drude à un terme 22

III) Equation de Moffitt..... 23
IV) Niveau d'approximation des équations semi empiriques..... 26
Chapitre IV. DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE ET DICHROISME CIRCULAIRE DANS L'ULTRA VIOLET LOINTAIN..... 28
I) Dispersion optique rotatoire de l'hélice α..... 28
II) Dispersion optique rotatoire de la pelote statistique..... 29
III) Dispersion optique rotatoire des chaînes β..... 30
IV) Dispersion optique rotatoire de la poly-L-proline..... 30
V) Dichroïsme circulaire..... 31
Chapitre V. NOUVELLE METHODE D'ANALYSE DE LA DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE DANS LE VISIBLE ET LE PROCHE ULTRA VIOLET:EQUATION DE DRUDE A DEUX TERMES.... 33
I) Etablissement de l'équation..... 33
a) hélice α..... 33
b) signification des paramètres A_{193} et A_{225}..... 34
c) pelote statistique..... 35
II) Détermination d'hélicité..... 36
a) polypeptides et protéines en solution aqueuse..... 36
b) polypeptides et protéines en solution dans des solvants organiques. 37
c) comparaison des résultats obtenus en solution aqueuse et en solution organique..... 37
d) comparaison de l'équation de Drude à deux termes et de l'équation de Moffitt..... 38
e) conclusions..... 38
Chapitre VI. SENSIBILITE DES DIFFERENTES METHODES DE DETERMINATION DE STRUCTURE HELICOIDALE AUX VARIATIONS NON STRUCTURALES..... 40
I) Hypothèses..... 40
a) absence de structures organisées autre que l'hélice α d'enroulement droit..... 40
b) absence d'effets Cotton extrinsèques..... 41
c) insensibilité des paramètres rotatoires aux variations non structurales..... 41
II) Sensibilité des paramètres rotatoires aux variations non structurales... 42
a) contribution des effets Cotton aux paramètres rotatoires..... 43
b) sensibilité des différents paramètres rotatoires..... 43

ETUDE DE L'ABSORPTION ET DE L'ACTIVITE OPTIQUE ASSOCIEES AUX CHROMOPHORES NON PEPTIDIQUES: APPLICATIONS AU FERRICYTOCHROME c DE COEUR DE CHEVAL

Chapitre I. ABSORPTION ET ACTIVITE OPTIQUE DES GROUPES AROMATIQUES..... 47

I) Absorption des groupes aromatiques..... 47

a) ionisation de la tyrosine..... 47

b) perturbation par le solvant..... 48

c) déplacement vers le bleu par dénaturation..... 48

II) Activité optique des groupes aromatiques..... 49

Chapitre II. PORPHYRINES ET METALLOPORPHYRINES..... 51

I) Théorie du champ de ligands..... 51

II) Porphyrines et metalloporphyrines..... 53

a) nomenclature..... 53

b) spectres d'absorption..... 53

c) activité optique..... 55

Chapitre III. QUELQUES PROPRIETES DES CYTOCHROMES c..... 56

Chapitre IV. ETUDE STRUCTURALE DU FERRICYTOCHROME c DE COEUR DE CHEVAL..... 58

I) Absorption dans la région des groupes aromatiques..... 58

II) Dispersion optique rotatoire entre 220 nm et 300 nm..... 60

III) Absorption du ferricytochrome c et du ferrihème undécapeptide dans les régions d'absorption du groupe prosthétique..... 61

IV) Dispersion optique rotatoire du ferricytochrome c et du ferrihème undécapeptide dans la région de Soret..... 63

a) Dispersion optique rotatoire du ferricytochrome c..... 64

b) dispersion optique rotatoire de l'hème undécapeptide..... 64

c) conclusions..... 65

V) Dichroïsme circulaire du ferricytochrome c..... 66

CONCLUSIONS GENERALES..... 69

REFERENCES..... 72

INTRODUCTION

L'étude de l'activité optique des polypeptides et des protéines en vue de la détermination de leurs structures secondaire et tertiaire a connu ces dernières années un essort prodigieux.

Les connaissances de l'activité optique des polypeptides et des protéines pratiquement limitées il y a dix ans, du fait des difficultés instrumentales, à la rotation à la raie jaune du sodium, englobent aujourd'hui tout un ensemble de données allant de l'infra rouge proche à l'ultra violet lointain, et ceci pour de nombreux modèles polypeptidiques de structure connue.

Nous nous proposons dans cette thèse de décrire et de discuter un certain nombre de résultats que nous avons obtenus dans ce domaine par l'étude de l'activité optique associée aux transitions optiquement actives.

Le travail en grande partie publié se divise en deux parties distinctes : l'étude générale de la structure secondaire des polypeptides et des protéines l'étude de la structure tertiaire d'une protéine particulière, le ferricytochrome c de coeur de cheval.

Il nous a semblé nécessaire avant de présenter nos résultats de décrire les différentes théories de l'activité optique. Ceci forme la première partie de la thèse.

On trouvera en appendice les références et les tirés à part de notre travail personnel qui peut se résumer ainsi :

-) détermination de l'activité optique dans l'ultra violet lointain de certaines conformations des polypeptides (Références 1 et 5)

-) élaboration d'une nouvelle méthode d'analyse de la dispersion optique rotatoire dans le visible et le proche ultra violet (Références 2, 3 et 4)

-) étude de la sensibilité des paramètres structuraux aux variations non structurales (Référence 6)

-) étude de l'absorption et de la dispersion optique rotatoire associées aux chromophores aromatiques du ferricytochrome c (Références 7 et 8) ;

-) étude de l'absorption et de la dispersion optique rotatoire associées au chromophore prosthétique du ferricytochrome c (Références 9 et 10) ;

-) étude du dichroïsme circulaire du ferricytochrome c (Référence 11).

PREMIERE PARTIE

ORIGINES ET THEORIES DE L'ACTIVITE OPTIQUE

CHAPITRE I

DECOUVERTE DE L'ACTIVITE OPTIQUE

La découverte du pouvoir optique rotatoire, c'est à dire de la propriété que possèdent certaines substances de faire tourner le plan de polarisation de la lumière linéairement polarisée, remonte au début du 19ème siècle. Arago [1] observe en 1811 que le quartz cristallin possède un pouvoir optique rotatoire, et quelques années plus tard Biot montre que cette propriété n'est pas limitée aux cristaux, mais qu'elle existe également pour des solutions de certaines substances et même pour certains gaz. C'est en 1848 que Pasteur énonce les principes structuraux qui déterminent si une substance est optiquement active. L'examen de cristaux de tartrate optiquement inactifs lui révèle l'existence d'hémièdres énantiomorphes. Il sépare manuellement les cristaux dextrogyres et lévogyres et il observe que mis en solution séparément ces cristaux possèdent une activité optique identique en valeur absolue mais de signes opposés [2a]. Pasteur soupçonne qu'à la différence macroscopique des cristaux correspond une différence microscopique au niveau de la molécule. Il énonce la condition sine qua non de l'activité optique : pour qu'une substance soit optiquement active il faut qu'elle ne soit pas superposable à son image dans un miroir :

"Si l'on considère les objets matériels, quels qu'ils soient, sous le rapport de leurs formes et de la répétition de leurs parties identiques, on ne tarde pas à reconnaître qu'ils se distribuent en deux grandes classes dont voici les caractéristiques : les uns placés devant une glace donnent une image qui leur est superposable l'image des autres ne pourrait les recouvrir, bien qu'elle reproduise fidèlement tous leurs détails. Un escalier droit, une tige à feuilles distiques, un cube, le corps humain.... voilà des corps de la première catégorie. Un escalier tournant, une tige à feuilles insérées en spirales, une vis une main, un tétraèdre irrégulier.... voilà autant de formes du second groupe. Ces derniers n'ont pas de plan de symétrie" [2b].

Si ce sont Le Bell et van't Hoff qui mettent en évidence la relation entre activité optique et carbone asymétrique, c'est à Pasteur que revient le mérite de distinguer clairement entre l'activité optique due à un carbone asymétrique et

l'activité optique due à la dissymétrie de la molécule :

"Imaginez un escalier tournant dont les marches seraient des cubes, ou tout autre objet à image superposable. Détruisez l'escalier et la dissymétrie aura disparu. La dissymétrie de l'escalier n'était que le résultat du mode d'assemblage de ses marches élémentaires...

Imaginez, au contraire, le même escalier tournant formé de tétraèdres irréguliers pour marches. Détruisez l'escalier, et la dissymétrie existera encore, parce que vous aurez à faire à un ensemble de tétraèdres"[2c].

Nous verrons par la suite que cette distinction entre dissymetrie et asymétrie faite il y a plus d'un siècle est fondamentale lors de l'étude de l'activité optique des polypeptides et des protéines.

CHAPITRE II

GRANDEURS MACROSCOPIQUES DE L'ACTIVITE OPTIQUE

A tout faisceau lumineux est associé un champ électrique et un champ magnétique vibrant à angle droit l'un par rapport à l'autre perpendiculairement à la direction de propagation du rayon. Le champ électrique associé à une lumière monochromatique linéairement polarisée oscille sinusoïdalement dans une direction bien déterminée de l'espace. Fresnel montre en 1822 que la lumière linéairement polarisée est un réalité composée d'une lumière polarisée circulaire droite et d'une lumière polarisée circulaire gauche, les vecteurs E_D et E_G égaux tournant en sens contraires à des vitesses égales.

Si les vecteurs E_D et E_G tournent en sens contraires à des vitesses différentes, le vecteur résultant E tout en étant linéairement polarisé subit une rotation (figure 1a). Etant donné que la vitesse de propagation d'une onde lumineuse est une fonction de l'indice de réfraction n du milieu, on peut dire qu'en ce qui concerne le pouvoir optique rotatoire, la propriété essentielle d'un milieu optiquement actif est qu'il possède des indices de réfraction n_D et n_G différents pour la lumière polarisée circulaire droite et pour la lumière polarisée circulaire gauche. En d'autres termes, le milieu présente de la biréfringence circulaire. On peut montrer que la rotation du plan de polarisation par unité de longueur de substance traversée par la lumière est égale à :

$$\alpha_{rad} = \frac{\pi}{\lambda}(n_G - n_D) \qquad (1)$$

où λ est la longueur d'onde de la lumière.

En solution on utilise les quantités : rotation spécifique en degrés α et rotation molaire en degrés M définies par:

$$[\alpha] = 100\,\frac{\alpha}{cl} \qquad (2) \qquad\qquad [M] = \frac{M}{100}\,[\alpha] \qquad (3)$$

où c est la concentration du soluté en %, l le trajet optique de la lumière en décimètres et M la masse moléculaire du soluté. Lors de l'étude du polymère, et

donc des polypeptides et des protéines on utilise couramment la rotation par résidu $[m]$ ou $[R]$ définie par :

$$[R] = \frac{MRW}{100}[\alpha] \qquad (4)$$

où MRW est la masse moléculaire moyenne du motif monomère, pour les protéines en général 115.

Pour tenir compte du champ interne les rotations sont multipliées par le facteur de Lorentz : $3/(n^2 + 2)$. Les quantités corrigées de l'effet de champ interne sont notées : $[\alpha]'$ $[R]'$, $[M]'$.

Les rotations observées expérimentalement correspondent en général à des valeurs de $n_G - n_D$ de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} au plus. Le pouvoir optique rotatoire est donc la conséquence d'une très petite différence d'indice de réfraction du milieu pour la lumière polarisée circulaire droite et pour la lumière polarisée circulaire gauche.

La biréfringence circulaire donnant lieu au pouvoir optique rotatoire dépend de la longueur d'onde de la lumière incidente. Cette dépendance a été observée par Biot qui note que l'angle de rotation du plan de polarisation augmente en général en valeur absolue de la lumière rouge à la lumière violette. Biot conclut que la dispersion optique rotatoire suit une loi en $1/\lambda^2$. Il observe une exception à cette règle : l'acide tartrique qui présente en valeur absolue des rotations plus élevées dans le vert. L'explication de cette dispersion "anormale" est donnée en 1896 par Cotton.

Cotton montre que le pouvoir optique rotatoire prend son origine dans les bandes d'absorption des substances optiquement actives. Il observe qu'au voisinage d'une bande d'absorption la rotation croit vers un maximum, décroit vers une rotation nulle à la longueur d'onde du maximum d'absorption, passe par un minimum de l'autre côté de la bande d'absorption (figure 2). Cette variation de la rotation en fonction de la longueur d'onde est appelée un effet Cotton. Cotton observe de plus qu'au voisinage d'une bande d'absorption la lumière est polarisée elliptiquement (figure 1b). Il montre que cette ellipticité provient d'une absorption différente de la lumière polarisée circulaire droite et de la lumière polarisée circulaire gauche (figure 2). En d'autres termes, le milieu présente du dichroïsme circulaire.

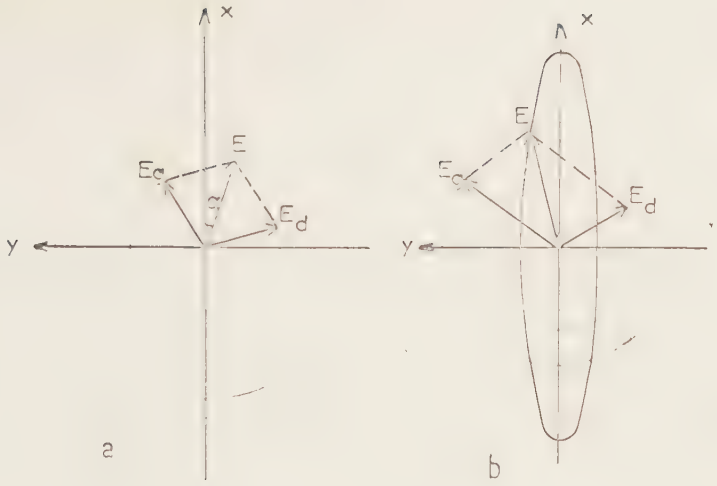


Figure 1. a: rotation du vecteur E lorsque la vitesse de rotation des vecteurs E_G et E_D est différente; b: ellipse décrite par le vecteur E lorsque $E_D \neq E_G$.

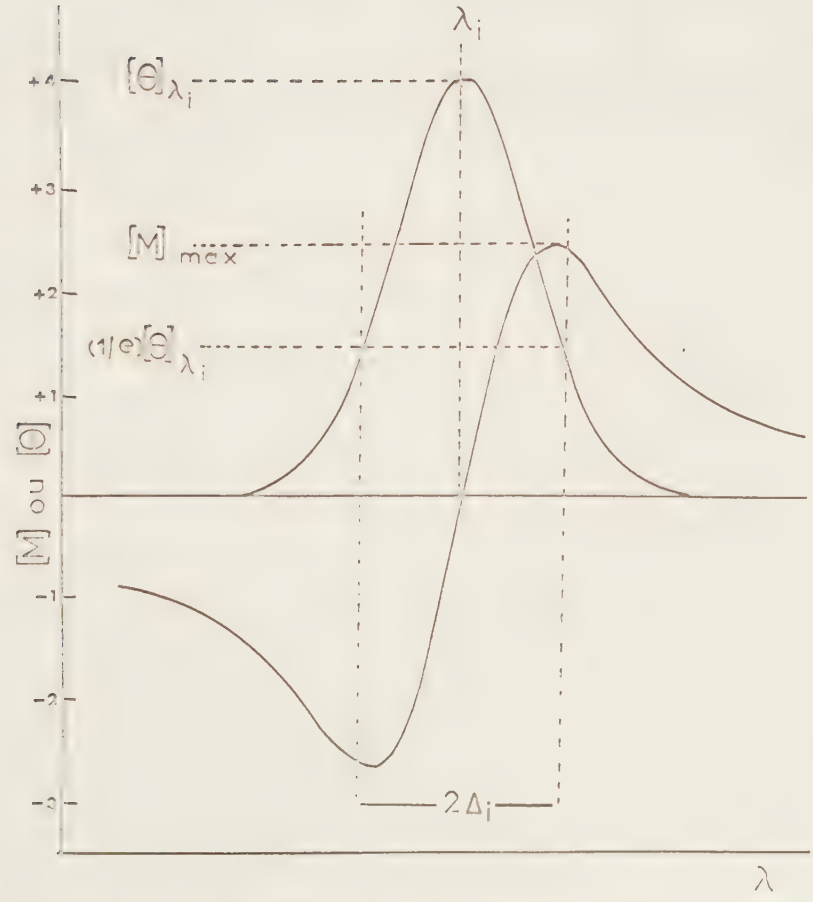


Figure 2. Effet Cotton et bande dichroïque positifs.

La différence d'absorption $\varepsilon_G - \varepsilon_D$ qui donne lieu au dichroïsme circulaire est faible, au plus le 1/100 de l'absorption moyenne $(\varepsilon_G + \varepsilon_D)/2$ du milieu. L'ellipse que décrit le vecteur E est donc très allongée et l'on peut montrer que l'ellipticité $[\theta]$ définie comme la tangente (petit axe/grand axe) est proportionnelle à la différence d'absorption :

$$[\theta] = 3300(\varepsilon_G - \varepsilon_D) \qquad (5)$$

Comme pour la rotation, on définit des ellipticités molaires $[\theta]$ ou molaires par résidu $[\theta]_{res}$ ou corrgiées par le facteur de Lorentz $[\theta']$.

Il est évident que les deux phénomènes : biréfringence circulaire et dichroïsme circulaire, ont lieu simultanément. On ne devrait pas en principe parler de la rotation du plan de polarisation, mais de la rotation du grand axe de l'ellipse. Toutefois les ellipticités sont faibles et la distinction ne devient nécessaire qu'au voisinage immédiat d'une bande d'absorption.

CHAPITRE III

THEORIES DE L'ACTIVITE OPTIQUE

I - THEORIES CLASSIQUES.

L'existence d'une activité optique pour une substance donnée, dépend de la capacité d'un champ magnétique H et de sa variation en fonction du temps $\partial H/\partial t$ de contribuer à la présence d'un moment électrique induit p et inversement de la capacité d'un champ électrique E et de sa variation en fonction du temps $\partial E/\partial t$ de contribuer à la présence d'un moment magnétique induit m :

$$p = \alpha E + \gamma H - \frac{\beta}{c} \frac{\partial H}{\partial t} \qquad (6)$$

$$m = H + \gamma E + \frac{\beta}{c} \frac{\partial E}{\partial t} \qquad (7)$$

On peut montrer en effet que les indices de réfraction n_D et n_G pour les lumières polarisées droite et gauche de fréquence ω sont alors égaux à :

$$n_D = n - 2\pi\omega g \qquad (8)$$

$$n_G = n + 2\pi\omega g \qquad (9)$$

où g est égal à : $4\pi N (\beta/c) (n^2 + 2)/3$

La condition nécessaire et suffisante pour une activité optique, $n_D \neq n_G$ devient : $\beta \neq 0$. En substituant les équations (8) et (9) dans l'équation (3) on obtient :

$$[M] = \frac{288\pi^2}{\lambda^2} N_o \frac{n^2 + 2}{3} \beta \qquad (10)$$

Différents modèles classiques ont été proposés pour relier l'activité optique à la structure moléculaire. Nous citerons les modèles de Drude et de Kuhn [3].

a) Modèle de Drude

Drude a pris en considération le modèle d'un électron asservi à se déplacer le long d'une trajectoire hélicoïdale. Il a pu montrer que dans ces conditions le paramètre β est relié au rayon r et au pas $2\pi s$ de l'hélice par :

$$\beta = \frac{4}{3}\frac{e^2}{m^2}\frac{r^2 s}{r^2 + s^2}\frac{1}{\omega_o^2 - \omega^2} \qquad (11)$$

e et m sont respectivement la charge et la masse de l'électron, et ω et ω_o sont respectivement les fréquences d'oscillation de la lumière et de l'électron.

En substituant cette valeur de β dans l'équation (10) on obtient une formulation de la dispersion optique rotatoire :

$$M = 4{,}06\ 10^{12}\ \frac{n^2 + 2}{3}\ \frac{r^2 s}{r^2 + s^2}\ \frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} \qquad (12)$$

Cette équation n'est évidemment valable que si la fréquence d'oscillation de la lumière est nettement différente de la fréquence d'oscillation de l'électron.

La longueur d'onde λ_o de l'équation (12) correspond à un maximum d'absorption. Chaque bande optiquement active contribue à la rotation et la dispersion optique rotatoire peut être exprimée par :

$$M = \sum_i \frac{A_i \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \qquad (13)$$

où les constantes A_i sont déterminées par la forme des différentes trajectoires hélicoïdales. L'équation (13) qui présente une dépendance en $1/(\lambda^2 - \lambda_o^2)$ porte le nom d'équation de Drude.

b) Modèle de Kuhn

Le modèle proposé par Kuhn pour expliquer l'origine de l'activité optique diffère totalement du modèle de Drude. Kuhn prend en considération un système d'oscillateurs couplés non coplanaires et situés à une certaine distance l'un de l'autre. Ce modèle rend compte de l'absorption différente des lumières polarisées circulaires droite et gauche. Il explique donc surtout le dichroïsme circulaire. La formulation de la dispersion optique rotatoire proposée par Kuhn présente la même dépendance en $1/(\lambda^2 - \lambda_o^2)$ que l'équation de Drude.

II - THEORIES QUANTIQUES

Si les deux modèles classiques de l'activité optique que nous venons de décrire permettent d'expliquer un certain nombre de phénomènes, en particulier la dépendance de la rotation en fonction de la longueur d'onde, il est nécessaire pour relier de manière valable le paramètre β à la structure moléculaire de faire appel aux données de la mécanique quantique.

En 1928 Rosenfeld [4] a montré 1) que pour une transition i donnée le paramètre β est relié au produit scalaire du moment électrique de transition p_i et du moment magnétique de transition m_i :

$$\beta = \frac{2c}{3\hbar} \frac{\mathrm{Im}(p_i . m_i)}{\omega_i^2 - \omega^2} \qquad (14)$$

et 2) que pour toute substance optiquement active la somme sur toutes les bandes d'absorption de $\mathrm{Im}(p_i . m_i)$ est nulle :

$$\sum_i \mathrm{Im}(p_i . m_i) = 0 \qquad (15)$$

En substituant l'équation (14) dans l'équation (10) on obtient :

$$M' = \frac{48}{hc} N_o \frac{n^2 + 2}{3} \sum_i \frac{\lambda_i^2 \, \mathrm{Im}(p_i . m_i)}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \qquad (16)$$

La quantité importante qui détermine la contribution d'une transition à l'activité optique est $I_m(m_i . p_i)$. Condon [5] donne à cette quantité qu'il appelle force rotatoire le symbole R_i. Cette force rotatoire dépend de la grandeur des moments électrique et magnétique de transition et de leur direction relative. Il apparait donc que des bandes d'absorption faibles peuvent contribuer notablement à la rotation (p_i et m_i parallèles) et qu'inversement des bandes d'absorption intenses peuvent ne pas contribuer à la rotation (p_i et m_i perpendiculaires ou m_i très petit).

Pour un système moléculaire à grand nombre d'électrons il est en général impossible d'effectuer un calcul des fonctions d'onde conduisant à des valeurs théoriques de R_i. On peut cependant utiliser des méthodes de perturbation, en partant

des fonctions d'onde du groupement de la molécule. La perturbation est donnée doit par le champ de tous les autres dipoles induits (théorie de Kirkwood), soit en supposant à priori le groupement placé dans un potentiel asymétrique (théorie de Condon).

a) Théorie de la polarisabilité de Kirkwood

Kirkwood [6] considère une substance optiquement active comme étant formée de différents groupes possédant une symétrie cylindrique. Il montre que dans ces conditions la force rotatoire d'une transition peut se mettre sous la forme :

$$R_i = R_i^o + R_i^1 + R_i^2 \qquad (17)$$

R_i^2 provient de l'asymétrie inhérente aux groupes eux mêmes : ce terme est donc associé aux interactions entre moments magnetique et électrique de transition d'un même groupe. R_i^1 provient d'interactions entre moment magnétique de transition d'un groupe et moment électrique de transition d'un groupe différent. R_i^o provient d'interactions entre moments électriques de transition de différents groupes.

Kirkwood admet que toute la contribution à la rotation provient du terme R_i^o, donc d'interactions entre moments électriques de transition des différents groupes. Il ignore délibérément la contribution à la rotation des termes R_i^1 et R_i^2. Dans ces conditions il lui est possible de relier l'activité optique à la polarisabilité, l'anisotropie et la configuration spatiale des différents groupes.

Les limitations de la théorie de Kirkwood sont les suivantes :

-) La contribution à la rotation dépend, entre autres choses, du produit de polarisabilité de deux groupes différents. Etant donné que les bandes d'absorption peu intenses contribuent peu à la polarisabilité, ces bandes doivent contribuer faiblement à la rotation. Or ceci n'est pas toujours le cas. La contribution de ces transitions à la rotation est inclue dans les termes R_i^1 ou R_i^2 qu'il n'est donc pas toujours justifié d'ignorer. La théorie de Kirkwood ne s'applique pas de ce fait à des substances optiquement actives possédant des bandes d'absorption peu intenses qui contribuent de manière appréciable à la rotation (p.e. cétones).

-) Kirkwood calcule les moments électriques induits des différents groupes à partir de potentiels dipole-dipole. Un tel potentiel n'est évalué correctement que si les différents groupes sont relativement espacés. La théorie ne s'applique donc pas à des molécules compactes.

b) Théorie du potentiel asymétrique de Condon, Altor et Eyring [7]

Cette théorie montre qu'une transition non optiquement active pour un chromophore isolé peut le devenir si le chromophore se trouve placé dans un potentiel de dissymétrie convenable. Ce potentiel revient en fait au potentiel créé par les dipoles environnants de la théorie de Kirkwood. Cependant la théorie du potentiel asymétrique est applicable à des substances optiquement actives possédant des bandes d'absorption peu intenses contribuant de manière notable à la rotation.

CHAPITRE IV

THEOREME DE KRONIG ET KRAMERS

Nous avons vu que l'activité optique se manifeste d'une part par la rotation du plan de polarisation, d'autre part par l'ellipticité de la lumière polarisée au voisinage d'une bande d'absorption optiquement active. Ces deux phénomènes correspondent aux différences des parties réelles et imaginaires de l'indice de réfraction et sont donc reliés par les relations générales de Krönig et Krämers [8]. Moffitt et Moscowitz [9] ont explicité ces relations qui deviennent :

$$M_\lambda = \frac{2}{\pi} \int \theta_{\lambda'} \frac{\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \qquad (18)$$

$$\theta_\lambda = -\frac{2}{\pi\lambda} \int M_{\lambda'} \frac{\lambda'^2}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \qquad (19)$$

Ces auteurs ont montré également que la force rotatoire d'une transition est proportionnelle à la surface de la bande dichroïque correspondante :

$$R_i = 0{,}696\ 10^{-42} \int \frac{\theta'_\lambda}{\lambda} d\lambda \qquad (20)$$

(ceci est à rapprocher de la force dipolaire d'une transition qui est proportionnelle à la surface de la bande d'absorption).

Si l'on admet que la bande dichroïque est Gaussienne, l'ellipticité s'exprime en fonction des trois paramètres suivants : valeur de l'ellipticité extremum $\theta_{\lambda i}$ longueur d'onde λ_i de cette ellipticité ; largeur de bande de la bande dichroïque Δ_i :

$$\theta_\lambda = \theta_{\lambda i} \exp\left[-\left(\frac{\lambda - \lambda_i}{\Delta_i}\right)^2\right] \qquad (21)$$

En substituant dans l'équation (18) on obtient :

$$M_\lambda = \frac{2\,\theta_{\lambda_i}}{\pi} \int \exp\left[-\left(\frac{\lambda - \lambda_i}{\Delta_i}\right)^2\right] \frac{\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \qquad (22)$$

Si, comme cela est en général le cas, $\lambda_i \gg \Delta_i$ cette équation peut s'écrire :

$$[M] = \frac{2\,\theta_{\lambda_i}}{\pi} \exp\left[-\left(\frac{\lambda - \lambda_i}{\Delta_i}\right)^2\right] \left[\int_0^{(\lambda-\lambda_i)/\Delta_i} \exp(y^2)dy - \frac{\Delta_i}{2(\lambda + \lambda_i)}\right] \qquad (23)$$

Pour une bande dichroïque Gaussienne la force rotatoire peut s'exprimer par (voir équation (20)) :

$$R_i = 0{,}696\ 10^{-42}\ \pi^{1/2}\ \theta_{\lambda_i}\ \frac{\Delta_i}{\lambda_i} \qquad (24)$$

et en substituant dans l'équation (24) on obtient :

$$[M] = \frac{R_i}{0{,}696\ 10^{-42}}\ \frac{\lambda_i}{\Delta_i}\ \frac{2}{\pi} \exp\left[-\left(\frac{\lambda - \lambda_i}{\Delta_i}\right)^2\right] \left[\int_0^{(\lambda-\lambda_i)/\Delta_i} \exp(y)^2dy - \frac{\Delta_i}{2(\lambda+\lambda_i)}\right] \qquad (25)$$

La dispersion optique rotatoire associée à un effet Cotton peut donc s'exprimer en fonction des trois paramètres de la bande dichroïque correspondante : la force rotatoire R_i qui détermine le signe et l'amplitude de l'effet Cotton, c'est à dire la différence de la rotation entre le maximum et le minimum - la largeur de bande Δ_i qui est à peu près égale à la distance entre un extremum et le centre la longueur d'onde de l'ellipticité extremum λ_i qui correspond au centre de l'effet Cotton. A une bande dichroïque positive est associé un effet Cotton positif (l'extremum situé à la longueur d'onde la plus élevée est un maximum) et inversement à une bande dichroïque négative est associé un effet Cotton négatif (l'extremum situé à la longueur d'onde la plus élevée est un minimum (figure 2).

L'équation (25) permet de représenter la dispersion optique rotatoire d'un effet Cotton quelque soit la longueur d'onde. Si $|\lambda-\lambda_i|$ est plus grand que 2,5 Δ_i environ, c'est à dire dès que l'on s'éloigne du centre de l'effet Cotton, l'équation (25) peut s'écrire en première approximation :

$$[M] = \frac{R_i}{0{,}696\ 10^{-42}}\ \frac{2}{\pi} \left[\frac{\lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} + \frac{\lambda_i \Delta_i^2}{4(\lambda - \lambda_i)^3}\right] \qquad (26)$$

A des longueurs d'onde encore plus éloignées du centre de l'effet Cotton le deuxième terme entre crochet de l'équation (26) devient négligeable et l'on obtient :

$$M = \frac{R_i}{0{,}696\ 10^{-42}} \frac{2}{\pi} \frac{\lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \qquad (27)$$

Cette équation n'est autre que l'équation de Drude. En général un terme de Drude est exprimé sous la forme :

$$\frac{A_i\ \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2}$$

et le paramètre A_i de ce terme est relié à la force rotatoire de la transition correspondante par la relation :

$$A_i = 0{,}92\ 10^{42}\ R_i \qquad (28)$$

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'ACTIVITE OPTIQUE ASSOCIEE AUX CHROMOPHORES PEPTIDIQUES DES POLYPEPTIDES ET DES PROTEINES · DETERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE.

INTRODUCTION

Nous avons vu dans la partie précédente que la détermination sur des bases théoriques de la structure moléculaire, à partir des données de l'activité optique nécessite la connaissance d'un grand nombre de paramètres (position de toutes les bandes d'absorption, moments électriques et moments magnétiques de transition, polarisabilité des différents groupes...) dont les valeurs pour des molécules complexes ne sont généralement pas connues. Par ailleurs, jusqu'à ces dernières années les mesures de dispersion optique rotatoire (DOR) et de dichroïsme circulaire (DC) étaient limitées par l'instrumentation aux domaines du visible et du proche ultra violet. En conséquence, pour les polypeptides et les protéines dont les bandes d'absorption associées aux chromophores peptidiques sont situées dans l'ultra violet lointain, les données de DC étaient inexistantes et celles de DOR limitées à une variation monotone de la rotation en fonction de la longueur d'onde sans présence d'effets Cotton. De ce fait, les premières méthodes utilisées pour relier l'activité optique à la structure des polypeptides et des protéines : rotation à la raie jaune du sodium, équation de Drude à un terme, avaient un caractère presqu'entièrement empirique.

Ce n'est qu'en 1956, et toujours en l'absence de données de l'activité optique dans l'ultra violet lointain, que Moffitt à partir d'un certain nombre d'hypothèses a essayé de relier sur des bases théoriques la DOR dans le visible et le proche ultra violet à la structure des polypeptides et des protéines. Pour établir l'équation qui porte son nom, Moffitt a tout d'abord calculé, à partir des données connues sur les amides simples, le spectre d'absorption dans l'ultra violet lointain des polypeptides α hélicoïdaux, puis a développé une théorie de l'activité optique en termes d'oscillateurs couplés. Il s'est avéré malheureusement que les hypothèses à la base de l'équation de Moffitt sont erronées, et que comme l'équation de Drude à un terme, elle a un caractère semi empirique.

Lorsqu'en 1961 les premières mesures de DOR ont été effectuées dans l'ultra violet lointain, il est apparu que les différentes conformations que peuvent adopter les polypeptides et les protéines (hélice α, chaîne β, hélices de type polyproline I et II, pelote statistique) sont caractérisées par des DOR très différentes. Il devient alors possible, sans faire appel à des notions théoriques très poussées, de déterminer la structure des polypeptides et des protéines par comparaison à des

modèles de structure connue.

Enfin connaissant les paramètres: force rotatoire, position et largeur de bande des différents effets Cotton associés aux chromophores peptidiques dans différentes configurations il devient possible de calculer la DOR dans le visible et le proche ultra violet en termes de ces paramètres.

CHAPITRE I

PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DES CHROMOPHORES PEPTIDIQUES ISOLES

I) TRANSITIONS $\pi \longrightarrow \pi^+$

Les premières études des transitions électroniques associées aux amides simples ont été effectuées en 1953 [10].

A des longueurs d'onde supérieures à 120 nm le spectre d'absorption de la formamide (amide non substituée) présente une bande à 172 nm (transition appelée $N \rightarrow V_1$) et une bande à 135 nm (transition appelée $N \rightarrow V_2$). Pour la diméthylformamide (amide disubstituée) ces bandes apparaissent à des longueurs d'onde nettement plus élevées, respectivement à 198 nm et 162 nm. Le spectre d'absorption des peptides présente une bande vers 185 nm ($N \rightarrow V_1$) [11] des mesures d'absorption n'ont pas été effectuées en dessous de 150 nm, mais par interpolation on peut situer la transition $N \rightarrow V_2$ des peptides vers 148 nm.

Ces transitions $N \rightarrow V_1$ et $N \rightarrow V_2$ sont attribuées à l'excitation des 4 électrons π non saturés du groupe planaire

$$O = C - N \begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix}$$

La direction de polarisation de la transition $N \longrightarrow V_1$ mesurée par Peterson et Simpson [12] fait un angle de 9° environ avec l'axe N -O. On peut admettre que la direction de polarisation de la transition $N \longrightarrow V_2$, qui n'a pas été mesurée expérimentalement, est orthogonale à celle de la transition $N \longrightarrow V_1$. Enfin les forces oscillatoires des transition $N \rightarrow V_1$ et $N \rightarrow V_2$ calculées dans le cas des amides simples sont égales respectivement à 0,25 et 0,20 [10,11].

II) TRANSITION $n \longrightarrow \pi^+$

Peterson et Simpson [12] ont observé dans le cas des amides simples une bande d'absorption située à une longueur d'onde légèrement plus élevée que la transition $N \longrightarrow V_1$. La caractérisation de cette transition d'intensité très faible est rendue difficile par la proximité de la transition $N \longrightarrow V_1$ intense. Toutefois, cette bande a été associée à une transition $n \rightarrow$ dont les caractéristiques sont les suivantes: intensité très faible; déplacement vers le bleu dans des solvants de polarité élevée direction de polarisation hors du plan formé par le groupe amide.

CHAPITRE II

PROPRIETES OPTIQUES DES AGREGATS DE CHROMOPHORES PEPTIDIQUES: SQUELETTE PEPTIDIQUE

I) TRANSITIONS $\pi \rightarrow \pi^*$

La formation à partir de chromophores peptidiques d'une chaîne polypeptidique peut entrainer deux sortes de perturbations des spectres d'absorption:

-) des perturbations excitoniques dues à des interactions entre même état excité des différents chromophores peptidiques

-) des perturbations dues à des interactions non résonantes entre un chromophore dans un état excité donné et tous les autres chromophores dans un état excité différent

Dans le cas des polypeptides α hélicoïdaux la théorie excitonique a été développée par Moffitt [13].

Etant donné les interactions entre groupes peptidiques voisins, les transitions $N \rightarrow V_1$ et $N \rightarrow V_2$ sont dédoublées. La transition $N \rightarrow V_1$ par exemple est constituée d'une composante polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice et de deux composantes dégénérées polarisées perpendiculairement à l'axe de l'hélice. Dans l'état excité de la transition polarisée parallèlement, les moments électriques de tous les chromophores peptidiques sont en phase ; dans l'état excité des transitions polarisées perpendiculairement, la différence de phase entre deux chromophores voisins est égale à $2\pi/P$, P étant le nombre de chromophores par tour d'hélice. Du fait des interactions électrostatiques entre différents moments électriques, les énergies des états excités des transitions polarisées parallèlement et perpendiculairement à l'axe de l'hélice sont différentes. Moffitt a calculé cette énergie de séparation dans le cas des polypeptides α hélicoïdaux :

pour la transition $N \rightarrow V_1$: $\nu_1 = \nu_{1\parallel} - \nu_{1\perp} = -2800\ cm^{-1}$

pour la transition $N \rightarrow V_2$: $\nu_2 = \nu_{2\parallel} - \nu_{2\perp} = -3130\ cm^{-1}$

Il fallait donc s'attendre dans le cas des polypeptides α hélicoïdaux à un dédoublement des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et à une polarisation différente des deux composantes dédoublées. La transition polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice ayant l'énergie la plus faible devait être située à la longueur d'onde la plus élevée.

Par ailleurs les perturbations dues aux interactions non résonantes devaient entrainer un effet hypochrome de la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$.

Ces hypothèses ont été vérifiées expérimentalement vers 1960 par l'étude de l'absorption des polypeptides synthétiques dans l'ultra violet lointain [14-16]. L'hypochromicité et le dédoublement de la transition $N \rightarrow V_1$ ont été observés pour l'acide poly-L-glutamique et la poly-L-lysine en solution. Ces deux polypeptides possèdent en fonction du pH, soit une structure α hèlicoïdale, soit une structure en pelote statistique. Lorsque la structure est celle de l'hélice α (acide poly-L-glutamique pH 4,3 ; poly-L-lysine pH 11) le spectre d'absorption dans l'ultra violet lointain présente un maximum vers 190 nm et, bien que très faible, un épaulement est apparent vers 205 nm [14,15]. Dans les deux cas le coefficient d'extinction molaire maximum par résidu est égal à 4000. Par dénaturation (acide poly-L-glutamique pH 7 ; poly-L-lysine pH 7) l'épaulement à 205 nm disparait et la valeur du maximum d'absorption à 190 nm augmente d'environ 60 %. Le maximum observé à 190 nm pour les polypeptides α hélicoïdaux doit correspondre à la transition polarisée perpendiculairement à l'axe de l'hélice, l'épaulement à 205 nm à la transition polarisée parallèlement. Ceci a été confirmé par des mesures d'absorption, en lumière polarisée, de polypeptides synthétiques orientés à l'état solide [16]. De plus l'énergie de séparation observée (3700 cm^{-1}) est assez proche de la valeur prédite (2800 cm^{-1}).

II) TRANSITION $n \rightarrow \pi^*$

La présence de la transition $n \rightarrow \pi^*$ aux environs de 225 nm a été mise en évidence dans le cas des polypeptides par l'étude de l'absorption de films orientés en lumière polarisée [16] et par l'étude de l'absorption en fonction du solvant [17]. En raison de sa force oscillatoire très faible et de sa direction de polarisation elle n'est pas dédoublée comme les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$.

III) PREVISIONS CONCERNANT L'ACTIVITE OPTIQUE DES POLYPEPTIDES α HELICOIDAUX

a) transitions $\pi \rightarrow \pi^*$

Aux transitions $N \rightarrow V_1$ et $N \rightarrow V_2$ dédoublées du fait des perturbations excitoniques, doivent correspondre respectivement deux bandes dichroïques centrées aux longueurs d'onde des maximums d'absorption. Etant donné que $\sum_i R_i$ doit être égale à zéro (équation (15)) les forces rotatoires dues aux interactions résonantes des deux bandes dichroïques doivent être de même grandeur mais de signes opposés. En fait,

elles différeront en raison du transfert des forces rotatoires qui dépendra de l' orientation des transitions.

b) transition $n \rightarrow \pi^+$

Moffitt a admis que la force rotatoire de la transition $n \rightarrow \pi^+$ des polypeptides α hélicoïdaux est négligeable. Toutefois Schellman et Oriel [18] ont montré par la suite qu'une activité optique importante peut être associée à cette transition. Si l'on tient compte des perturbations des états électroniques du groupe peptidique dues au champ électrostatique de l'hélice, une composante du moment électrique de la transition $\pi \rightarrow \pi^+$ s'associe au moment magnétique de la transition $n \rightarrow \pi^+$, et de ce fait une force rotatoire non négligeable apparait.

CHAPITRE II

ACTIVITE OPTIQUE DES POLYPEPTIDES ET DES PROTEINES DANS LE VISIBLE ET LE PROCHE ULTRA VIOLET

I) ROTATION A LA RAIE JAUNE DU SODIUM

On avait observé depuis longtemps que la plupart des protéines présentent dans le visible des rotations négatives. Pour les protéines globulaires natives les rotations spécifiques à la raie jaune du sodium $[\alpha]_{589}$ sont comprises en général entre - 20° et - 70°. Par dénaturation cette rotation augmente en valeur absolue et l'ensemble des protéines dénaturées ont des rotations spécifiques à 589 nm comprises entre -70° et -120°. Il a été suggéré que la rotation d'une protéine native dans le visible résulte de la superposition de deux rotations de signes opposés: l'une positive, qui disparait par dénaturation, est associée à la dissymétrie de la molécule hélicoïdale: l'autre négative est associée à l'asymétrie des acides-L-aminés [19]. La synthèse puis l'étude de polypeptides synthétiques de structure connue semblaient confirmer ce point de vue. Les changements de la rotation à 589 nm accompagnant les transitions hélice α - pelote statistique sont de même signe et de même ordre de grandeur que les changements observés par dénaturation des protéines.

Ce sont Schellman et Schellman [20] qui ont les premiers essayé de déterminer de manière systématique le contenu α hélicoïdal des protéines en utilisant les rotations à la raie jaune du sodium. Ces auteurs ont recherché la protéine qui subit par dénaturation la plus forte variation de la rotation à 589 nm. Ils ont admis que cette dernière (la β lactoglobuline) possède à l'état natif une structure entièrement hélicoïdale. Le contenu hélicoïdal des autres protéines est obtenu par comparaison (Tableau I). Le choix de la β lactoglobuline en tant que protéine entièrement hélicoïdale s'est avéré malheureux, et il est admis aujourd'hui que cette protéine possède peu de structure en hélice α. Ceci suffit à montrer que la détermination hélicoïdale effectuée à partir de la rotation à une longueur d'onde dans le visible est sujette à de nombreuses erreurs.

TABLEAU I

PROPRIETES ROTATOIRES DE CERTAINES PROTEINES [20]

protéines:	$[R]_{589}$ (a)	% d'hélice (b)	λ_c nm (c)
β -lactoglobuline	+ 93,6	100	251
ribonucléase	+ 35,8	38	233
insuline	+ 61,8	66	267
serum albumine	+ 52,4	56	265
ovalbumine	+ 72,9	78	266
lysozyme	+ 42,7	46	254
pepsine	+ 22,5	24	
chymotrypsine	+ 44,0	47	241
chymotrypsinogène	+ 36,3	39	239

(a): différence de la rotation à 589 nm entre la protéine native et la protéine dénaturée.

(b): % d'hélicité de la proteine native.

(c): valeur du paramètre λ_c de l'équation de Drude à un terme pour la protéine native.

II) EQUATION DE DRUDE A UN TERME

Nous avons vu dans la première partie que la DOR de toutes substances optiquement actives peut être représentée dans des régions éloignées des effets Cotton par une équation de Drude multiterme (équation (13)) :

$$M = \sum_i \frac{A_i \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \qquad (29)$$

où les paramètres A_i sont reliés aux forces rotatoires des effets Cotton centrés en λ_i (équation (28)), et où la sommation se fait sur tous les effets Cotton. Pour de nombreuses protéines globulaires il a été observé que la DOR peut être représentée par une équation de Drude à un terme lorsque les mesures sont limitées dans le visible [21] :

$$R = \frac{A_c \lambda_c^2}{\lambda^2 - \lambda_c^2} \qquad (30)$$

Dans ces conditions une représentation graphique de $[R'] \lambda^2$ en fonction de $[R']$ fournit une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine sont égales respectivement à λ_c^2 et $A_c \lambda_c^2$. Puisque la somme des forces rotatoires d'une substance optiquement active est nulle (équation 15)), il est évident que la DOR n'est pas la conséquence de l'existence d'un seul effet Cotton. Les paramètres A_c et λ_c de l'équation de Drude à un terme sont des moyennes statistiques des différents paramètres A_i et λ_i [21].

De nombreux auteurs ont essayé d'établir de manière empirique, une relation entre les valeurs de λ_c et le contenu hélicoïdal des protéines globulaires. En effet, conjointement à la rotation plus lévogyre obtenue par dénaturation, la valeur de λ_c décroit de 250-260 nm (valeur caractérisant de nombreuses protéines globulaires natives) à 210-220 nm. Toutefois, pour des polypeptides de synthèse et certaines protéines dont le contenu hélicoïdal est élevé, la DOR ne peut pas être représentée par une équation de Drude à un terme, ceci même si les mesures sont limitées dans un domaine très étroit de longueur d'onde. La classification des protéines était donc la suivante:

-) valeur de λ_c comprise entre 210-220 nm: contenu hélicoïdal faible;

-) valeur de λ_c comprise entre 250-260 nm: contenu hélicoïdal moyen;

-) impossibilité de représenter la DOR par une équation de Drude à une terme: contenu hélicoïdal élevé.

Le bien fondé d'une telle classification est contestable. Il apparait toutefois au vue des valeurs de λ_c reportées dans le Tableau I qu'une protéine telle que la β lactoglobuline n'aurait pas été choisie comme modèle de protéine entièrement hélicoïdale.

III) EQUATION DE MOFFITT

La théorie de l'activité optique des polypeptides α hélicoïdaux a été traitée par Moffitt en termes d'oscillateurs couplés [22,23].

La contribution à la rotation de la transition $N \rightarrow V_1$ dédoublée peut s'écrire:

$$R'_{N \rightarrow V_1} = \frac{a_{1\parallel} \lambda_1}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + \frac{a_{1\perp} \lambda_1}{\lambda^2 - \lambda_1^2} \qquad (31)$$

où $a_{i\perp}$ et $a_{i\parallel}$ sont reliés respectivement aux forces rotatoires des transitions polarisées parallèlement et perpendiculairement à l'axe de l'hélice, et où λ_1 et λ_1 sont les positions des maxima d'absorption de ces transitions.

Etant donné que la force rotatoire de la transition polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice est de même grandeur mais de signe opposé à la force rotatoire de la transition polarisée perpendiculairement à l'axe de l'hélice on a:

$$a_{i\parallel} + a_{i\perp} = 0 \qquad (32)$$

Dans ces conditions on peut remplacer l'équation (31) par:

$$R'_{N \rightarrow V_1} = \frac{a_1 \lambda_1^2}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + \frac{b_1 \lambda_1^4}{(\lambda^2 - \lambda_1^2)^2} \qquad (33)$$

les différents paramètres étant définis par:

$$a_1 = (a_{1\parallel} + a_{1\perp}) + b_1 \qquad (34)$$

$$b_1 = (a_{1\parallel} - a_{1\perp})(\lambda_{1\parallel} - \lambda_{1\perp})/\lambda_1 \qquad (35)$$

$$\lambda_1 = (\lambda_{1\parallel} + \lambda_{1\perp})/2 \qquad (36)$$

ceci à condition que:

$$|\lambda_{III}^2 - \lambda_{\perp}^2| \ll |\lambda^2 - \lambda_i^2| \qquad (37)$$

Le même raisonnement permet de représenter la contribution à la rotation de la transition $N \rightarrow V_2$ par une équation analogue à (33). La contribution à la rotation des transitions $N \rightarrow V_1$ et $N \rightarrow V_2$ peut donc s'écrire:

$$R' = \sum \frac{a_i \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} + \sum \frac{b_i \lambda_i^4}{(\lambda^2 - \lambda_i^2)^2} \qquad (38)$$

Si l'on détermine trois paramètres a_o, b_o et λ_o tels que:

$$a_o \lambda_o^2 = \sum_i a_i \lambda_i^2 \qquad (39)$$

$$b_o \lambda_o^4 = \sum_i a_i \lambda_i^2(\lambda_i^2 - \lambda_o^2) + b_i \lambda_i^4 \qquad (40)$$

$$0 = \sum_i a_i \lambda_i^2(\lambda_i^2 - \lambda_o^2)^2 + 2b_i \lambda_i^4(\lambda_i^2 - \lambda_o^2) \qquad (41)$$

on peut, à condition que λ_o ainsi déterminé soit beaucoup plus petit que λ, transformer l'équation (38) en:

$$R' = \frac{a_o \lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + \frac{b_o \lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2} \qquad (42)$$

Cette équation qui porte le nom de Moffitt-Yang a la particularité de posséder un terme en $1/\lambda^4$. Ce terme provient du dédoublement des transitions $N \rightarrow V_1$ et $N \rightarrow V_2$ en composantes dont les forces rotatoires sont à peu près égales en valeur absolue mais de signes opposés. D'autres transitions situées dans l'ultra violet lointain (série de Rydberg, transitions associées aux chaînes latérales optiquement actives) auront une dépendance en $1/\lambda^2$ et leur contribution à la rotation est incorporée dans le terme en a_o. Puisque le paramètre λ_o est déterminé principalement par les transitions optiquement actives situées aux longueurs d'onde les plus élevées, ceci n'est pas valable si des transitions situées à des longueurs d'onde supérieures à la transition $N \rightarrow V_1$ contribuent à la rotation. Moffitt admet que la contribution à la rotation de la transition $n \rightarrow \pi^*$ située vers 225 nm est négligeable.

Dans ces conditions les valeurs des paramètres λ_o et b_o sont des propriété-

tés intrinsèques du squelette peptidique, tandis que la valeur du paramètre a_o dépend des conditions telles que la nature du solvant, la nature des chaines latérales etc...

A partir des données connues pour les amides simples, Moffitt a calculé les paramètres b_o et λ_o pour des polypeptides α hélicoïdaux d'enroulement droit et d'enroulement gauche.

pour une hélice droite: $\lambda_o = 200$ nm ; $b_o = -580°$

pour une hélice gauche: $\lambda_o = 200$ nm ; $b_o = +580°$

Par destruction de l'hélice la dépendance en $1/\lambda^4$ disparait, la DOR peut être représentée par une équation de Drude à un terme et de ce fait b_o est nul.

Pour déterminer expérimentalement les paramètres de l'équation de Moffitt-Yang il suffit de porter

$$R'(\lambda^2-\lambda_o^2) \quad \text{en fonction de} \quad (\lambda^2 - \lambda_o^2)^{-1}$$

et de rechercher la valeur de λ_o qui permet d'obtenir une droite dans un domaine aussi étendu de longueur d'onde que possible. La pente et l'ordonnée de cette droite donnent respectivement les paramètres b_o et a_o.

Pour des polypeptides synthétiques α hélicoïdaux d'enroulement droit les valeurs obtenues expérimentalement sont:

$$\lambda_o = 212 \text{ nm} \; ; \; b_o = -650°$$

L'accord entre théorie et expérience est donc excellent.

Cohen et Szent-Gyorgyi [19] ont suggéré de représenter la DOR d'un polypeptide ou d'une protéine par une équation de Moffitt-Yang dont le paramètre λ_o est fixé invariablement à 212 nm. Nous avons vu en effet que pour les polypeptides ou les protéines possédant une structure en pelote statistique la DOR peut être représentée par une équation de Drude à un terme, et il se trouve que la valeur du paramètre λ_o est proche de 212 nm. Dans ces conditions la variation de b_o entre - 650° pour un polypeptide entièrement α hélicoïdal d'enroulement droit et zéro pour un polypeptide ou une protéine en pelote statistique permet d'établir une échelle entre la valeur du paramètre b_o et le contenu α hélicoïdal. C'est sur ces bases que depuis 1956 jusqu'à nos jours l'équation de Moffitt-Yang a été utilisée.

Malheureusement il s'est vite révélé que le bon accord entre les valeurs théoriques de b_o et de λ_o et les valeurs observées expérimentalement est entièrement fortuit. En effet, dans le traitement de l'activité optique des polypeptides α hélicoïdaux, Moffitt néglige certains termes. Pris en considération dans le contexte de la théorie, ces termes sont tels que les forces rotatoires des transitions pola-

risées perpendiculairement à l'axe de l'hélice s'annulent. Un traitement ultérieur de l'activité optique par Moffitt, Fitts et Kirkwood [24] corrige cette erreur mais indique que du point de vue théorique aucune signification ne peut être attachée aux paramètres semi empiriques b_o et λ_o.

IV) NIVEAU D'APPROXIMATION DES EQUATIONS SEMI EMPIRIQUES

Etant donné qu'une équation de Drude à un terme :

$$R' = \frac{A_c \lambda_c^2}{\lambda^2 - \lambda_c^2} \tag{43}$$

ne permet pas de représenter la DOR des polypeptides α hélicoïdaux dans le visible et le proche ultra violet, et qu'il est nécessaire dans ces conditions de faire appel à une équation de type Moffitt, ou, comme nous le verrons par la suite, à une équation de Drude à deux termes, il est intéressant de montrer de quelle manière l'équation (43) se déduit d'une équation de Drude multiterme :

$$R' = \sum_i \frac{A_i \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \tag{44}$$

et dans quelles conditions elle est valable.
On peut toujours développer un terme tel que $1/(\lambda - \lambda_i)^{-1}$ en série de Taylor :

$$\frac{1}{\lambda^2 - \lambda_i^2} = \frac{1}{\lambda^2 - \lambda_c^2} + \frac{\lambda_i^2 - \lambda_c^2}{(\lambda^2 - \lambda_c^2)^2} + \frac{(\lambda_i^2 - \lambda_c^2)^2}{(\lambda^2 - \lambda_c^2)^3} + \cdots \tag{45}$$

En introduisant les notations originales de Schellman [21] :

$$_o m_1 = \sum_i A_i \lambda_i^2 \quad ; \quad _o m_2 = \sum_i A_i \lambda_i^4 \quad ; \quad _o m_3 = \sum_i A_i \lambda_i^6 \tag{46}$$

et en substituant l'équation (45) dans l'équation (44) on obtient :

$$R' = \frac{_o m_1}{\lambda^2 - \lambda_c^2} + \frac{_o m_2 - \lambda_c^2 \, _o m_1}{(\lambda^2 - \lambda_c^2)^2} + \frac{_o m_3 - 2\lambda_c^2 \, _o m_2 + \lambda_c^4 \, _o m_1}{(\lambda^2 - \lambda_c^2)^3} + \cdots \tag{47}$$

Si l'on choisit λ_c tel que :

$$\lambda_c^2 = \frac{o^m 2}{o^m 1} \tag{48}$$

le deuxième terme à droite de l'équation (47) s'annule et les paramètres A_c et λ_c sont reliés aux différents paramètres A_i et λ_i par les relations :

$$A_c \lambda_c^2 = \sum_i A_i \lambda_i^2 \tag{49}$$

$$A_c \lambda_c^4 = \sum_i A_i \lambda_i^4 \tag{50}$$

Il est évident qu'une équation de Drude à un terme permettra de reproduire la DOR si les termes d'ordre 3 et supérieurs de l'équation (47) sont négligeables :

$$\text{Erreur} = \frac{\sum_i A_i \lambda_i^6 - A_c \lambda_c^6}{(\lambda^2 - \lambda_c^2)^3} \tag{51}$$

Ceci est vrai si :

$$\lambda_i^2 - \lambda_c^2 \ll \lambda^2 - \lambda_c^2 \tag{52}$$

Puisque les paramètres A_c et λ_c de l'équation de Drude à un terme sont déterminés par les relations (49) et (50), il est clair que ce sont les transitions optiquement actives situées aux longueurs d'onde les plus élevées qui vont principalement déterminer la valeur du paramètre λ_c. Si ces transitions sont proches les unes des autres, et si la somme des forces rotatoires est grande en valeur absolue par rapport aux forces rotatoires prises isolément, l'inégalité (52) est vérifiée, et la DOR peut être représentée par une équation de Drude à un terme. Inversement, si la somme des forces rotatoires est faible en valeur absolue par rapport aux forces rotatoires prises isolément, l'inégalité (52) n'est pas vérifiée, et la DOR ne peut pas être représentée par une équation de Drude à un terme. Ceci est le cas des polypeptides α hélicoïdaux ce qui explique la nécessité de faire appel à une équation plus complexe. L'équation de Moffitt apparait alors comme tenant compte simplement d'un terme supplémentaire dans le développement limité.

CHAPITRE III

DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE ET DICHROISME CIRCULAIRE DANS L'ULTRA VIOLET LOINTAIN

I) DOR DE L'HELICE α

La DOR d'un polypeptide synthétique ou d'une protéine possèdant une structure α hélicoïdale est caractérisée dans l'ultra violet lointain, entre 250nm et 190nm, par un minimum négatif de rotation à 233 nm, par un épaulement vers 210-215 nm et par un maximum de rotation positif à 198 nm [25,26] (figure 3a). Il est évident qu'une telle courbe de DOR est due à plus d'un effet Cotton.

Il nous a été possible de décomposer la courbe de DOR en effets Cotton individuels [27]. Pour ceci nous avons utilisé une méthode des moindres carrés non linéaires programmée pour un ordinateur I.B.M. 1620 et nous avons essayé de restituer la DOR expérimentale à partir d'une somme d'équation de Moscowitz :

$$[m'] = \sum_i \frac{R_i \lambda_i}{\Delta_i} \exp\left[-\left(\frac{\lambda-\lambda_i}{\Delta_i}\right)^2\right] \left[\int_0^{(\lambda-\lambda_i)/\Delta_i} \exp(y^2)\, dy - \frac{\Delta_i}{2(\lambda+\lambda_i)}\right] \qquad (53)$$

chaque terme étant associé à un effet Cotton.

Pour obtenir une bonne restitution de la courbe de DOR entre 190 et 600 nm, il est nécessaire d'admettre l'existence de trois effets Cotton. Les paramètres : force rotatoire (R_i), centre (λ_i) et largeur de bande (Δ_i) de ces effets Cotton pour trois polypeptides α hélicoïdaux que nous avons étudiés sont reportés dans le tableau II.

Ces trois effets Cotton peuvent aujourd'hui être attribués à la transition $\pi \longrightarrow \pi^+$ dédoublée et à la transition $n \longrightarrow \pi^+$.

TABLEAU II

PARAMETRES DES EFFETS COTTON ASSOCIES A L'HELICE .

	1	2	3
	PAEMG(a)	APG(pH 4,3)(b)	PMEG(c)
R 10^{40} (d)	38,3 ± 0,4	41 ± 2	42,8 ± 0,8
A 10^{-4} (e)	0,352 ± 0,004	0,37 ± 0,02	0,393 ± 0,007
λ nm	192,2 ± 0,1	191,8 ± 0,3	192,0 ± 0,1
Δ nm	7,9 ± 0,1	8,7 ± 0,3	6,7 ± 0,3
R 10^{40}	-12,1 ± 0,6	-14 ± 2	-12,0 ± 0,8
A 10^{-4}	-0,111 ± 0,005	-0,13 ± 0,02	-0,110 ± 0,007
λ nm	208,8 ± 0,2	206,2 ± 0,7	207,9 ± 0,2
Δ nm	8,7 ± 0,3	9,4 ± 0,8	7,2 ± 0,4
R 10^{40}	-18.4 ± 0.3	-17,5 ± 0,4	-20,5 ± 0,4
A 10^{-4}	-0,169 ± 0.003	-0,160 ± 0,004	-0,118 ± 0,004
λ nm	224,0 ± 0,1	223,5 ± 0,2	223,1 ± 0,2
Δ nm	10,9 ± 0,1	10,8 ± 0,1	11,5 ± 0,2

(a): poly-γ morpholinyléthyl-L-glutamamide (eau-méthanol: 1-9)

(b): acide poly-L-glutamique (pH 4,3)

(c): poly-γ-méthoxyethyl-L-glutamate (eau-méthanol: 3-7)

(d): force rotatoire en ergs cm^3

(e): calculé d'après l'equation (28)

II) DOR DE LA PELOTE STATISTIQUE

La DOR d'un polypeptide possédant une structure en pelote statistique, de même que celle d'un certain nombre de protéines dénaturées, est caractérisée dans l'ultra violet lointain, entre 250 nm et 190 nm par un épaulement négatif vers 230-235 nm et un minimum de rotation négatif à 205 nm [25,26] (figure 3b).

Comme pour l'hélice α, il nous a été possible de décomposer la courbe de DOR en effets Cotton individuels [27]. Les paramètres de ces effets Cotton pour l'acide poly-L-glutamique à pH 7,0 sont reportés dans le tableau III. Si l'effet Cotton centré à 198 nm est associé à la transition π → π* qui dans le cas des polypeptides possédant une structure en pelote statistique, n'est pas dédoublée, et si l'effet Cotton centré à 217 nm peut être associé à la transition n → π* , l'existence d'un effet Cotton centré à 235 nm, de très faible force rotatoire il est vrai, n'a pas trouvé d'explication à ce jour. Nous avons vérifié par DC la présence d'une bande dichroïque associée à cet effet Cotton pour d'autres polypeptides possédant une structure en pelote statistique (poly-L-lysine pH 7, poly-morpholinyl-ethyl-L-glutamamide en solution aqueuse). Cet effet Cotton semble donc être une propriété intrinsèque du squelette peptidique. Dans le cas d'un polypeptide en pelote statistique il est nécessaire, pour obtenir une bonne restitution de la courbe de DOR, de tenir compte d'un fond de rotation provenant d'effets Cotton situés à des longueurs d'onde inférieures à 190 nm. Nous avons essayé de représenter ce fond de rotation par une équation de dispersion du type :

$$\frac{B\,Q^2}{\lambda^2 - Q^2} + \frac{C}{\lambda^2} \qquad (54)$$

Toutefois, il ne nous a pas été possible de déterminer simultanément les trois paramètres B, C et Q. Dans le tableau III nous avons reporté les différents paramètres des effets Cotton pour Q fixé arbitrairement à 10,0, 100,0 et 184,4 nm. Les paramètres : force rotatoire, centre et largeur de bande ne sont que très légèrement altérés.

Etant donné les différences notables entre la DOR dans l'ultra violet lointain d'un polypeptide possédant une structure α hélicoïdale et d'un polypeptide possédant une structure en pelote statistique, Blout et coll. [25,26] ont sug-

TABLEAU III

PARAMETRES DES EFFETS COTTON ASSOCIES A L'ACIDE POLY-L-GLUTAMIQUE pH 7,0

$R\ 10^{40}$	$-14,4 \pm 0,2$	$-14,4 \pm 0,2$	$-14,2 \pm 0,2$
$A\ 10^{-4}$	$-0,129 \pm 0,001$	$-0,132 \pm 0,002$	$-0,130 \pm 0,002$
λ nm	$197,6 \pm 0,1$	$197,5 \pm 0,1$	$197,6 \pm 0,1$
Δ nm	$8,4 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$
$R\ 10^{40}$	$1,9 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,2$
$A\ 10^{-4}$	$0,017 \pm 0,001$	$0,019 \pm 0,004$	$0,018 \pm 0,002$
λ nm	$216,8 \pm 0,4$	$216,7 \pm 0,7$	$216,6 \pm 0,4$
Δ nm	$10,1 \pm 0,8$	11 ± 1	$10,3 \pm 0,8$
$R\ 10^{40}$	$-0,13 \pm 0,05$	$-0,2 \pm 0,04$	$-0,13 \pm 0,05$
$A\ 10^{-4}$	$-0,0012 \pm 0,0005$	$-0,002 \pm 0,0004$	$-0,0012 \pm 0,0005$
λ nm	235 ± 3	230 ± 10	235 ± 3
Δ nm	10 ± 2	13 ± 6	10 ± 2
$B\ 10^{-4}$	500 ± 200	$0,15 \pm 0,07$	$0,002 \pm 0,001$
$C\ 10^{-4}$	50.000 ± 20.000	800 ± 600	660 ± 40
Q (a)	10,0	100,0	184,4

Pour la signification des différents symboles: voir tableau II

(a): paramètre invariable

géré d'utiliser les rotations à 233 nm (minimum de rotation) et à 198 nm (maximum de rotation) en tant que paramètres structuraux. Des valeurs de $[m']_{233} = -13000$ et de $[m']_{198} = +70000$ ont été adoptées pour un polypeptide α hélicoïdal, et de $[m']_{233} = -1700$ et $[m']_{198} = 0$ pour un polypeptide en pelote statistique. Une interpolation linéaire permet alors de déterminer le contenu α hélicoïdal. L'accord avec le contenu α hélicoïdal calculé a partir de b_o est en général assez bon.

III) DOR DES CHAINES β

Bien qu'il ne soit pas dans notre intention de discuter l'origine des transitions associées aux différentes conformations β, il n'est pas inutile de décrire rapidement les caractéristiques de la DOR et du DC de ces structures.

De nombreuses protéines présentent dans l'ultra violet lointain des courbes de DOR qui ne peuvent pas s'expliquer par un mélange de structures α hélicoïdale et en pelote statistique. Des mesures d'infra rouge indiquent que ces protéines possédent une grande proportion de structure β. Etant donné les faibles propriétés de solubilité des polypeptides synthétiques possédant une telle structure, les données de la DOR de modèles de structure β ne sont apparues que bien après celles de l'hélice α et de la pelote statistique.

C'est à l'état solide que nous avons obtenu les premières courbes de DOR dans l'ultra violet lointain d'un polypeptide possédant une structure β (poly-L-isoleucine) [28]. Elles sont caractérisées par un minimum de rotation négatif à 235 nm et un maximum de rotation positif vers 205-207 nm (figure 4c). Des mesures récentes de DOR et de DC de polypeptides et de protéines possédant cette structure en solution confirment nos premiers résultats [29-33]. Nous avons reporté dans le tableau IV les données de DOR et de DC concernant les différentes structures β que nous avons relevées dans la littérature.

IV) DOR DE LA POLY-L-PROLINE

Il faut signaler enfin la DOR de polypeptides qui possèdent une structure hélicoïdale différente de l'hélice α: la poly-L-proline I et la poly-L-proline II (figures 4a et 4b) [28,34,35]. Nous avons pu comme pour l'hélice α et la pelote statistique décomposer la courbe de DOR de la poly-L-proline II en effets Cotton individuels [27]. Les paramètres des deux effets Cotton responsables de la DOR sont reportés

TABLEAU IV

DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE ET DICHROISME CIRCULAIRE DE LA CHAINE .

	DOR				DC			
	minimum		maximum		minimum		maximum	
	λ nm	[m]	λ nm	[m]	λ nm	[θ]	λ nm	[θ]
Poly-L-isoleucine [28] état solide	230	-5000	207	+22000	218			
Poly-L-lysine [29] chauffée à 50°, 10' (antiparallèle)	230	-6300	205	+23000	218	-23000	195	
Poly-L-lysine [29] dans dodécyl sulfate (parallèle)	230				218	- 9000		
Poly-L-lysine [30] chauffée à 50°, 10'					217	-19000	195	+28000
Poly-L-lysine [31] chauffée à 50°, 10'	230	-6200	205	+29000				
Fibroïne de soie [32]	230	-5000	205	+24000				
Prédiction théorique [33] (antiparallèle)					220 R négatif		195 $R=10\times10^{-40}$	

TABLEAU V

PARAMETRES DES EFFETS COTTON ASSOCIES A LA POLY-L-PROLINE II

$R\ 10^{40}$	-33 ± 1
$A\ 10^{-4}$	$-0,30 \pm 0,01$
λ nm	$206,9 \pm 0,3$
Δ nm	$13,4 \pm 0,3$
$R\ 10^{40}$	5 ± 1
$A\ 10^{-4}$	$0,049 \pm 0,09$
λ nm	$221,0 \pm 0,6$
Δ nm	$10,5 \pm 0,3$
$B\ 10^{-4}$	$-0,173 \pm 0,008$
$C\ 10^{-4}$	2900 ± 200
Q	170 ± 17

pour la signification des différents symboles: voir tableau II

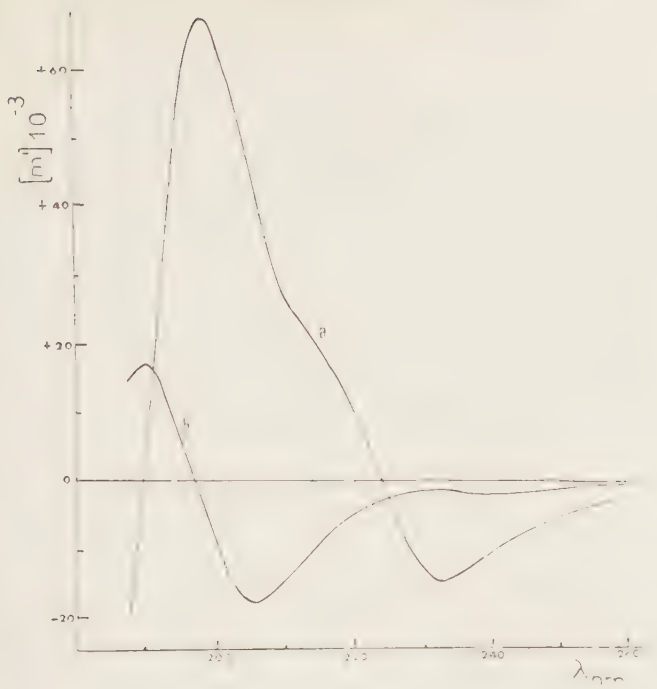


Figure 3. Dispersion optique rotatoire dans l'ultra violet lointain: a: hélice α; b: pelote statistique.

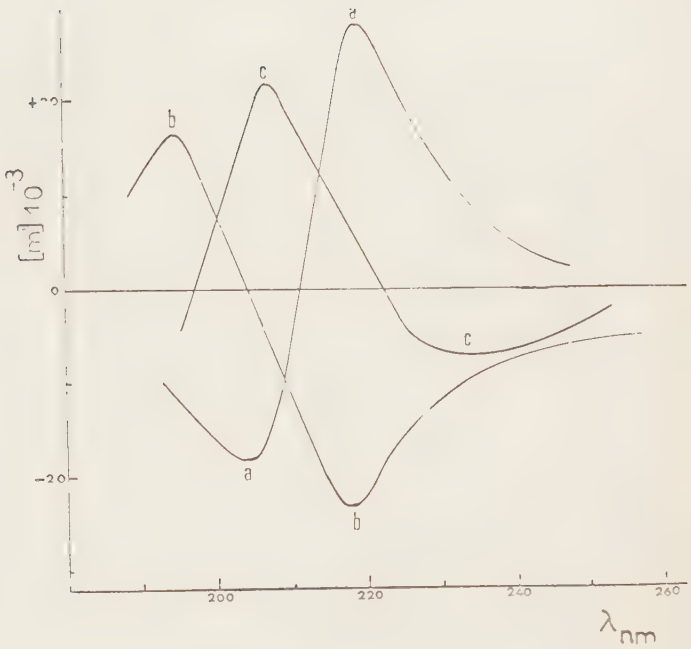


Figure 4. Dispersion optique rotatoire dans l'ultra violet lointain. a: poly-L-proline I: b: poly-L-proline II: c: chaine β.

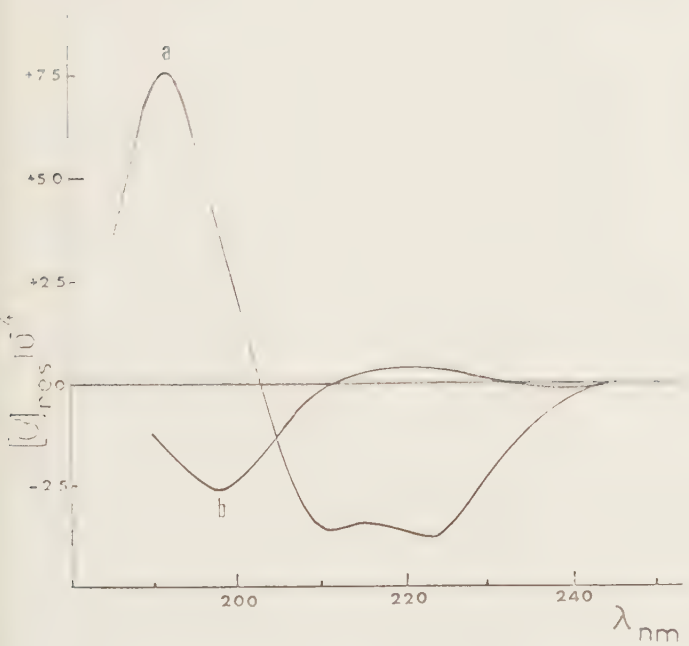


Figure 5. Dichroïsme circulaire dans l'ultra violet lointain. a: hélice α: b: pelote statistique.

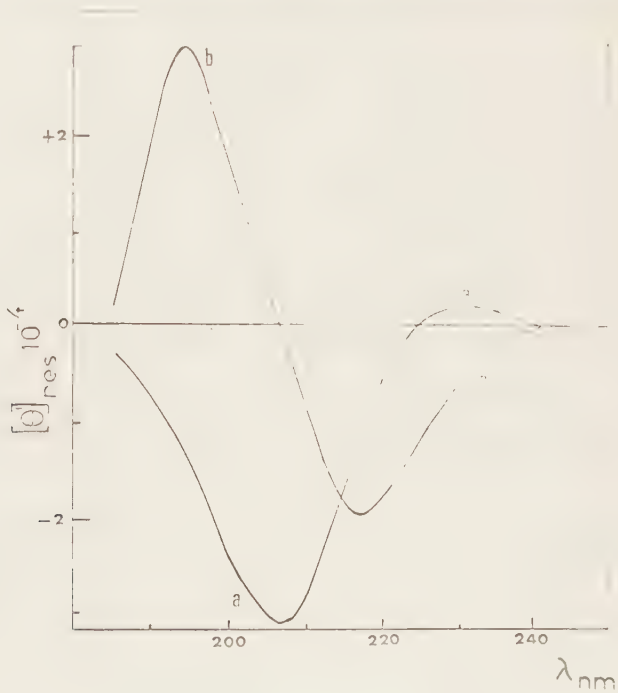


Figure 6. Dichroïsme circulaire dans l'ultra violet lointain. a: poly-L-proline II: b: chaine β.

dans le tableau V. Pour obtenir une bonne restitution de la courbe expérimentale il est nécessaire de tenir compte d'un fond de rotation; dans le cas de la poly-L-proline II il est possible de déterminer simultanément les trois paramètres B,C et Q.

Du fait de la faible solubilité de la poly-L-proline I en solution aqueuse les données de la DOR dans l'ultra violet lointain sont assez rares. Signalons enfin que des calculs théoriques concernant l'activité optique de la poly-L-proline I et de la poly-L-proline II ont été effectués récemment [36].

V) DICHROISME CIRCULAIRE

Les données de DC, qui pour des raisons instrumentales sont apparues après celles de la DOR, confirment l'existence des différents effets Cotton que nous venons de citer [29,30,37-39]. Il est de plus possible , par une transformation de Krönig et Krämers,de recalculer une courbe de DOR à partir des données expérimentales de DC. La différence entre la courbe observée et la courbe calculée donne des renseignements sur la contribution des bandes dichroïques hors du domaine spectral étudié. Nous avons reporté sur les figures 5 et 6 les courbes de DC de certaines structures polypeptidiques.

De l'ensemble des résultats que nous venons de citer il ressort que le nombre et les paramètres (force rotatoire, centre et largeur de bande) des effets Cotton associés aux chromophores peptidiques dépendent essentiellement de l'agencement des groupes peptidiques les uns par rapport aux autres. En d'autres termes, la DOR et le DC du polypeptide ou de la protéine étudié dépendent principalement de la structure secondaire. Ceci explique qu'il ait été possible à partir des données de la DOR dans des régions éloignées des effets Cotton d'obtenir, sur des bases semi empiriques, des renseignements concernant la structure de certains polypeptides et de certaines protéines.

Toutefois, si qualitativement les paramètres des différents effets Cotton dépendent de la structure de la macromolécule en solution, il faut s'attendre à ce qu'ils varient en fonction de la nature des chaînes latérales, du solvant, de l'environnement des groupes peptidiques, de la distribution des différentes régions structurées ect. Les variations des paramètres des effets Cotton de l'hélice α en fonction de la nature de la chaîne latérale sont par exemple apparentes dans le tableau II.

Les différentes méthodes d'analyse de la DOR que nous avons citées (rotation à la raie jaune du sodium, équation de Drude à un terme, équation de Moffitt-Yang, rotation à un extremum de la DOR) ignorent délibérément ces variations. C'est essentiellement pour minimiser leur influence sur la détermination des structures secondaires que nous avons développé une nouvelle méthode d'analyse de la DOR dans le visible et le proche ultra violet [40-42].

CHAPITRE IV

NOUVELLE METHODE D'ANALYSE DE LA DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE DANS LE VISIBLE ET LE PROCHE ULTRA VIOLET: EQUATION DE DRUDE A DEUX TERMES

I) ETABLISSEMENT DE L'EQUATION

Connaissant les paramètres des effets Cotton de l'hélice α et de la pelote statistique, on pourrait songer à représenter la DOR d'un mélange quelconque de ces deux structures par une équation de Drude multitermes, chaque terme étant associé à un effet Cotton.

a) hélice α

Pour l'hélice α la DOR devrait en principe être représentée par une équation de Drude à trois termes centrés respectivement à 192-193 nm, 206-208 nm et 223-224 nm environ. A partir des seules données du visible et du proche ultra violet il s'est révélé impossible de déterminer simultanément de manière précise les trois paramètres A_{193}, A_{206} et A_{223}. En effet il faut que dans le domaine spectral étudié la somme des trois termes de Drude représente exactement la contribution des trois effets Cotton. Or si l'erreur $(A_i \lambda_i \alpha_i^2)/4(\lambda^2 - \lambda_i^2)^3$ due à la représentation d'un effet Cotton isolé par un terme de Drude diminue rapidement dès que l'on s'éloigne du centre (2 % d'erreur environ à une distance équivalente à 5 largeurs de bande) (équation (26)), il n'en est pas de même pour les trois effets Cotton de l'hélice α. Du fait des forces rotatoires de signes différents, les contributions des effets Cotton dans le visible et le proche ultra violet s'annulent partiellement, et ceci plus rapidement que ne s'annulent les différents termes d'erreur. C'est ainsi qu'à 280 nm par exemple (longueur d'onde distante de 5,3 largeurs de bande de l'effet Cotton centré à 224 nm) la contribution à la rotation des trois effets Cotton centrés à 193 nm, 206 nm et 224 nm est égale respectivement à + 3300°, - 1520° et - 2810° dans le cas de l'acide poly-L-glutamique à pH 4,3. Les trois termes d'erreur introduits sont égaux à 0,6 %, 1,0 % et 2,1 % de la contribution respective des trois effets Cotton, soit une erreur globale de - 54°. Cette erreur est associée à une rotation observée de - 1030° et correspond donc à une erreur relative de 5,2 %. Ce n'

est qu'à des longueurs d'onde supérieures à 350 nm que l'erreur relative est inférieure à 2 %. Cette erreur qui atteint un minimum vers 450-500 nm, recroit d'ailleurs à des longueurs d'onde plus élevées. Dans ces conditions la méthode des moindre carrés ne converge pas.

Nous avons alors essayé de représenter la DOR de l'hélice α par une équation de Drude à deux termes. Fixant un terme à 193 nm, nous avons recherché la position du deuxième terme qui permet d'obtenir la meilleure reproduction dans un domaine de longueur d'onde aussi étendu que possible. Cette meilleure reproduction est obtenue lorsque le deuxième terme est centré à 225 nm. Les deux paramètres A_{193} et A_{225} de l'équation:

$$[m'] = \frac{A_{193}\,\lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} + \frac{A_{225}\,\lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2} \qquad (55)$$

se déterminent graphiquement en portant

$[m'](\lambda^2 - \lambda_{193}^2)/\lambda_{193}^2$ en fonction de $(\lambda_{225}^2)/(\lambda_{193}^2) \times (\lambda^2-\lambda_{193}^2)/(\lambda^2-\lambda_{225}^2)$

La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite formée par les points expérimentaux sont égales respectivement à A_{225} et A_{193}.

b) Signification des paramètres A_{193} et A_{225}

Il est évident que les deux paramètres A_{193} et A_{225} ne sont pas simplement reliés aux forces rotatoires des effets Cotton centrés à 193 nm et 224 nm par la relation (voir relation (28)):

$$A_i = 0.92\ 10^{42}\ R_i \qquad (56)$$

Le fait que la meilleure reproduction de la DOR soit obtenue avec un deuxième terme centré à 225 nm, position très proche de l'effet Cotton centré à 224 nm, est fortuit.

On peut illustrer la manière dont l'equation de Drude à deux termes centrés à 193 nm et 225 nm se déduit de l'équation de Drude à trois termes centrés à 193 nm, 206 nm et 224 nm d'après la méthode esquissée chapitre II (IV). Si tout en gardant un terme centré à 193 nm on essaye de représenter la DOR par deux termes de Drude il faut combiner les termes centrés à 206 nm et 224 nm. Les paramètres A_c et λ_c du nouveau terme obtenu, ainsi que l'erreur introduite se déterminent à partir des équations (49, 50, 51). Pour l'hélice α la valeur de λ_c est égale à 217 nm. Toutefois le terme

d'erreur que l'on introduit est important et s'ajoute à l'erreur déjà existante du fait de la représentation des trois effets Cotton par trois termes de Drude. Il n'est donc pas possible de reproduire la DOR dans un domaine étendu de longueur d'onde par cette équation. Pour compenser l'erreur existante, il suffit de créer artificiellement une nouvelle erreur de signe opposé. Ceci peut être obtenu en combinant une partie du terme de Drude centré à 193 nm au terme de Drude centré à 217 nm. La meilleure compensation de l'erreur est atteinte si le nouveau terme est centré à 225 nm, ce qui justifie l'équation de Drude à deux termes centrés à 193 nm et 225 nm. Les valeurs de A_{193} et A_{225} calculées à partir de cette équation (55) sont égales respectivement à + 3000 et - 2000 environ. Si les termes de Drude centrés à 193 nm et 225 nm représentaient uniquement la contribution des effets Cotton centrés à 193 n et 224 nm ces valeurs seraient égales respectivement à + 3700 et - 1600 environ.

c) pelote statistique

Bien que la DOR de la pelote statistique dans l'ultra violet lointain soit caractérisée par trois effets Cotton centrés respectivement à 198 nm, 217 nm et 235 n environ, seule la contribution de l'effet Cotton centré à 198 nm est importante dans le visible et le proche ultra violet ($R_{198} = -14\ 10^{-40}$). Dans un mélange hélice α - pelote statistique cet effet Cotton, proche de celui centré à 193 nm, sera facilement incorporé dans le terme A_{193}. Il est donc possible de représenter la DOR d'un mélange quelconque d'hélice α et de pelote statistique par une équation de Drude à deux termes centrés à 193 nm et 225 nm. Pour une pelote statistique la contribution au paramètre A_{193} sera principalement due à l'effet Cotton centré à 198 nm ce paramètre sera donc négatif. Quant au paramètre A_{225} il devrait être négligeable.

Nous verrons par la suite quelles sont les relations exactes entre les forces rotatoires des différents effets Cotton et les paramètres rotatoires A_{193} et A_{225}. Nous présentons auparavant les résultats que cette équation de Drude à deux termes nous a permis d'obtenir quant à la détermination structurale d'un certain nombre de polypeptides et de protéines.

II) DETERMINATION D'HELICITE

a) polypeptides et protéines en solution aqueuse

En utilisant l'équation de Drude à deux termes nous avons calculé les paramètres A_{193} et A_{225} pour un certain nombre de polypeptides et de protéines en solution aqueuse [40]. Les valeurs obtenues sont portées dans les tableaux VI et VII. Sur les figures 7 et 8 nous avons porté les valeurs de A_{193} en fonction des valeurs de A_{225}. La plupart des points expérimentaux s'alignent sur une droite:

$$A_{225} = - 0,55\ A_{193} - 430 \qquad (57)$$

Si l'on admet comme cela se fait pour toute détermination d'hélicité effectuée à partir des données de la DOR (nous reviendrons sur ce point par la suite) que

-) l'acide poly-L-glutamique à pH 4 est entièrement α hélicoïdal
-) l'acide poly-L-glutamique à pH 7 est entièrement en pelote statistique
-) les forces rotatoires des effets Cotton de l'hélice α et de la pelote statistique sont des fonctions linéaires respectivement du contenu hélicoïdal et du contenu en pelote statistique

on peut déterminer le contenu hélicoïdal à partir des deux paramètres A_{193} et A_{225} par les équations:

$$H(\%)_{193} = (A_{193} + 750)/36,5 \qquad (58)$$

$$H(\%)_{225} = -(A_{225} + 60)/19,9 \qquad (59)$$

Il est évident que le contenu hélicoïdal calculé à partir de ces deux paramètres différera pour les substances dont les points expérimentaux ne s'alignent pas sur la droite représentée par l'équation (57). C'est le cas par exemple de la poly-L-sérine, de la β lactoglobuline, du pepsinogène et de la poly-L-proline II. Pour les trois premiers composés des mesures d'infra rouge indiquent l'existence de structures β; quant à la poly-L-proline II l'existence d'une structure hélicoïdale autre que l'hélice α est bien établie. Il apparait donc que l'utilisation d'une équation de Drude à deux termes permet de différencier les polypeptides et les protéines possédant une structure organisée uniquement α hélicoïdale, des polypeptides et des protéines possédant une structure organisée différente.

TABLEAU VI

POLYPEPTIDES EN SOLUTION AQUEUSE

L-polypeptides de:	pH	A_{193}	A_{225}	$H(\%)_{193}$	$H(\%)_{225}$
acide glutamique	4	+ 2900	- 2050	100	100
acide glutamique	7	- 750	- 60	0	0
acide glutamique: lysine (1:1)	3	+ 1400	- 1180	59	57
	8	+ 240	- 590	27	27
acide glutamique: lysine:alanine (1:1:3)	3	+ 1800	- 1360	70	66
	8	+ 1470	- 1210	61	58
γ-morpholinyléthyl glutamamide:alanine (7:3)	7	+ 1520	- 1250	62	60
γ-morpholinyléthyl glutamamide	7	- 610	- 90	4	2
γ-morpholinyléthyl[a] glutamamide	7	+ 2020	- 1550	76	75
γ-morpholinyléthyl[b] glutamamide	7	+ 2500	- 1820	89	89
γ-méthoxyéthyl[b] glutamate	7	+ 2835	- 1980	98	97
sérine	7	+ 10	- 80	21	1
proline II	7	- 2680	- 590	-53	27

(a): méthanol:eau (5:5)

(b): méthanol:eau (7:3)

TABLEAU VII

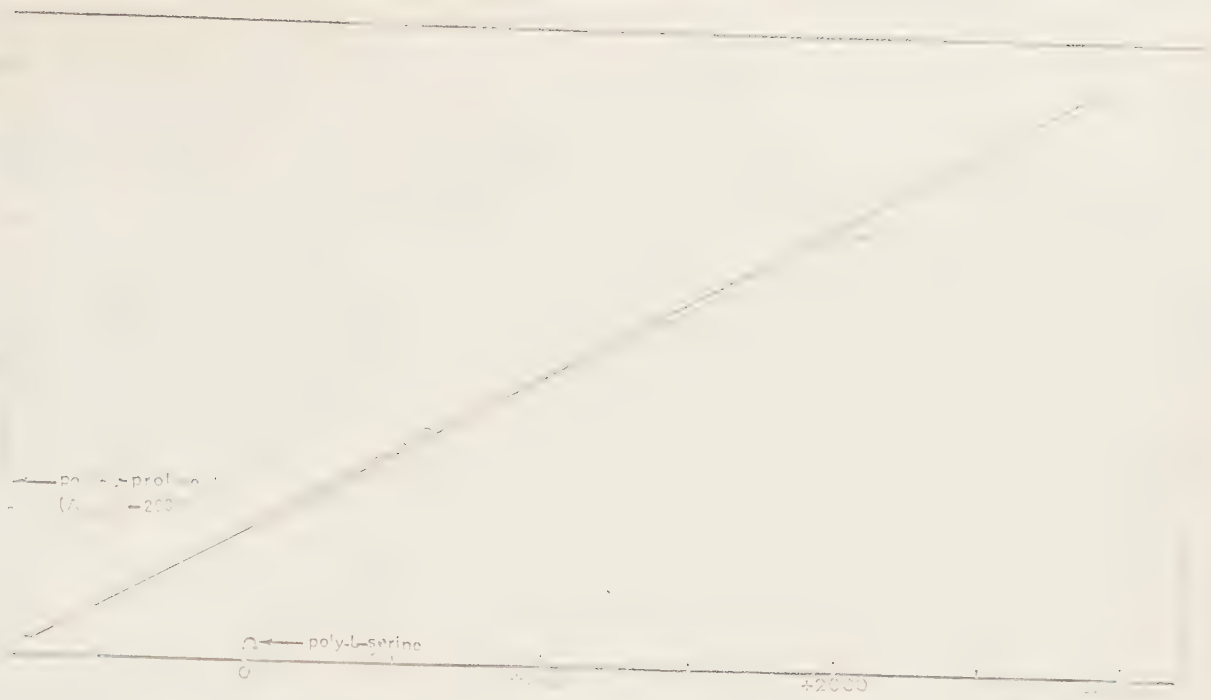
PROTEINES EN SOLUTION AQUEUSE

N° sur la figure 8	protéines [a]	A_{193}	A_{225}	$H(\%)_{193}$	$H(\%)_{225}$
1	paramyosine	+ 2780	- 1940	97	95
2	sérum albumine	+ 1250	- 1150	55	55
3	fibrinogène	+ 580	- 680	35	31
4	fibrinogène (8 M urée)	+ 200	- 500	26	22
5	fibrinogène (9 M urée)	+ 100	- 500	24	22
6	ribonucléase	+ 230	- 575	27	26
7	tropomyosine	+ 2410	- 1750	87	85
8	tropomyosine (pH 10)	+ 1325	- 1130	57	54
9	myosine	+ 1535	- 1200	63	58
10	L.M.M [b]	+ 2440	- 1770	88	86
11	H.M.M [c]	+ 1225	- 1020	54	49
12	β lactoglobuline	+ 420	- 420	32	18
13	pepsinogène	+ 60	- 250	22	10

(a): pH 5 à 8 à moins d'indications contraires

(b): méromyosine fraction légère

(c): méromyosine fraction lourde


poly-L-serine

b) polypeptides et protéines en solution dans des solvants organiques

Dans les tableaux VIII et IX nous avons reporté les valeurs de A_{193} et de A_{225} calculées pour un certain nombre de polypeptides et de protéines en solution dans des solvants organiques [41]. Sur les figures 9 et 10 nous avons porté les valeurs de A_{193} en fonction de A_{225}. La plupart des points expérimentaux s'alignent sur une droite de pente identique à celle obtenue en solution aqueuse:

$$A_{225} = - 0,55\ A_{193} - 280 \qquad (60)$$

Si l'on choisi comme modèle de polypeptide possédant une structure entièrement α hélicoïdale la poly-L-méthionine en solution dans le chloroforme, et comme modèle de polypeptide en pelote statistique la copoly-L-méthyl-S-cytéine:L-méthionine (1:1) en solution dans l'acide dichloracétique:acide trifluoracétique (1:1), on peut déterminer le contenu α hélicoïdal des polypeptides et des protéines en solution dans des solvants organiques à partir des deux paramètres A_{193} et A_{225} par les équations:

$$H(\%)_{193} = (A_{193} + 600)/36,2 \qquad (62)$$

$$H(\%)_{225} = - A_{225}/19,0 \qquad (63)$$

A nouveau un certain nombre de substances pour lesquelles les données d'infra rouge indiquent l'existence de structures β, ou pour lesquelles l'existence de structures hélicoïdales autres que l'hélice α est établie donnent des points expérimentaux qui ne s'alignent pas sur la droite représentée par l'équation (61).

c) comparaison des résultats obtenus en solution aqueuse et en solution organique

Le fait que deux relations différentes existent entre les paramètres A_{193} et A_{225} dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques indique que ces paramètres ne sont pas insensibles au solvant. On peut s'attendre à ce que ce soit la polarité du milieu qui influe, pour une structure donnée, sur les valeurs des paramètres des effets Cotton, et donc sur les paramètres A_{193} et A_{225}. Or si la diffé-

TABLEAU VIII

POLYPEPTIDES EN SOLUTION ORGANIQUE

L-polypeptides de:	solvants	A_{193}	A_{225}	$H(\%)_{193}$	$H(\%)_{225}$
méthionine	$CHCl_3$	+ 3020	- 1900	100	100
méthyl-S-cystéine: méthionine(1:1)	DCA·TFA(1:1)	- 600	0	0	0
γ-benzyl-glutamate	dioxane	+ 2710	- 1810	92	96
	dioxane·DMF(1:1)	+ 2630	- 1770	90	93
	$CHCl_3$	+ 2600	- 1680	89	89
	pyridine	+ 2200	- 1400	78	74
	DCA	- 50	- 250	15	13
γ-méthoxyéthyl glutamate	dioxane	+ 2320	- 1550	81	82
alanine	$CHCl_3$·TFA(1:9)	+ 245	- 455	23	24
	DCA:TFA(1:1)	+ 800	- 640	39	34
leucine	$CHCl_3$:TFA(1:1)	+ 1460	- 1100	57	58
	DCA·TFA(1:1)	+ 700	- 720	36	38
ε-carbobenzoxy lysine	$CHCl_3$	+ 2745	- 1780	93	94
	$CHCl_3$:DCA(4·6)	+ 100	- 270	19	14
méthyl-S-cystéine: méthionine(1:9)	$CHCl_3$:DCA(7:3)	+ 2320	- 1500	81	79
	DCA	+ 735	- 655	37	35
(2:8)	$CHCl_3$	+ 2700	- 1750	92	92
	DCA	+ 520	- 600	31	32
(3:7)	DCA	0	- 310	17	16
valine:méthionine(1·1)	DCA:TFA(2:8)	+ 90	- 370	19	20
5[(a)] O-acétyl-sérine	EDC:DCA(1·1)	+ 600	- 210	33	11
4	$CHCl_3$:DCA(7:3)	+ 530	- 220	31	11
3	$CHCl_3$:DCA(3:7)	+ 330	+ 340	27	-18
6	DCA	+ 380	- 125	28	7
1 méthyl-S-cystéine	$CHCl_3$:DCA(5:5)	+ 300	- 750	25	40
	DCA	+ 160	- 630	21	32
proline II	acide acétique	- 2100	- 750	-42	40
proline I	acide propionique	- 1460	+ 1180	-24	-62

(a): les numéros sont ceux portés sur la figure 9.

Abréviations: chloroforme ($CHCl_3$) diméthylformamide (DMF); acide dichloracétique (DCA); acide trifluoracétique (TFA); dichloréthylène (EDC).

TABLEAU IX

PROTEINES EN SOLUTION ORGANIQUE

	protéines	solvants	$A_{193}^{(b)}$	$A_{225}^{(b)}$	$H(\%)_{193}$	$H(\%)_{225}$
1[(a)]	tropomyosine	chloroéthanol	+ 2870	- 1880	96	99
2	globine M	"	+ 2240	- 1580	79	83
3	ovalbumine	"	+ 2000	- 1340	72	71
4	globine H	"	+ 1800	- 1290	67	68
5	ribonucléase	"	+ 1700	- 1230	64	65
6	histone	"	+ 1670	- 1210	63	64
7	sérum albumine	"	+ 1600	- 1095	61	58
8	lysozyme	"	+ 1200	- 850	50	45
9	insuline	"	+ 845	- 750	40	40
10	pepsine	"	+ 750	- 655	37	35
11	plasma albumine	"	+ 1290	- 1300	52	54
12	plasma albumine (oxydée)	"	+ 1060	- 800	46	42
13	plasma albumine	acide formique[(c)]	- 140	- 320	16	13
14	plasma albumine (oxydée)		+ 80	- 420	18	20

(a): les numéros sont ceux reportés sur la figure 10

(b): pour les protéines numérotées 1 à 10 les valeurs de a_o et b_o de l'équation de Moffitt, données en référence 43, ont été utilisées pour calculer les valeurs de A_{193} et A_{225} (voir équations (64) et (65)).

(c): la constante diélectrique de l'acide formique étant de 60, les valeurs de $H(\%)_{193}$ et $H(\%)_{225}$ ont été calculées en utilisant les relations (58) et (59).

rence de constante diélectrique est importante entre les solvants aqueux (D = 80) et la plupart des solvants organiques que nous avons utilisés, elle est relativement faible entre les différents solvants organiques (D = 2 à 20). Ceci explique que la plupart des points expérimentaux obtenus en portant A_{193} en fonction de A_{225} pour des polypeptides ou des protéines en solution dans des solvants organiques s'alignent sur une droite. L'acide formique (D = 60) et le méthanol (D = 40) sont deux exceptions, et les points expérimentaux s'alignent mieux sur la droite obtenue en solution aqueuse

Les vari ions en fonction du solvant des paramètres A_{193} et A_{225} sont telles que le paramètre $(A_{193} - A_{225})$ est pratiquement insensible à ces variations, tandis qu'au contraire le paramètre $(A_{193} + A_{225})$ y est très sensible [42]. On peut donc utiliser le paramètre $(A_{193} - A_{225})$ en tant que paramètre α hélicoïdal insensible aux variations de solvant. Le contenu α hélicoïdal se calcule à partir de l'équation:

$$H(\%)_{(193-225)} = (A_{193} - A_{225} + 650)/55,8 \qquad (63)$$

d) comparaison de l'équation de Drude à deux termes et de l'équation de Moffitt

L'équation de Drude à deux termes centrés à 193 nm et 225 nm et l'équation de Moffitt permettent toutes deux de représenter la DOR des polypeptides et des protéines dans des domaines de longueur d'onde comparables. Ces deux équations sont donc mathématiquement équivalente comme le montre d'ailleurs un developpement limité autour de λ_o. Pour λ_o = 212 nm on obtient les relations suivantes entre a_o, b_o, et A_{193}, A_{225}:

$$a_o = 0,829\ A_{193} + 1,13\ A_{225} \qquad (64)$$

$$b_o = -\ 0,142(A_{193} - A_{225}) \qquad (65)$$

e) conclusions

Basée sur la connaissance des effets Cotton de l'hélice α et de la pelote statistique, l'équation de Drude à deux termes que nous venons de décrire permet de calculer le contenu α hélicoïdal d'un certain nombre de polypeptides et de protéines à partir des paramètres rotatoires A_{193} et A_{225}. Ces deux paramètres sont en première approximation insensibles à la nature de la chaîne latérale et ne sont influencés de manière appréciable que par la constante diélectrique du solvant. Il

nous a été possible de classer les solvants en deux catégories: solvants de constante diélectrique élevée (supèrieure à 30-40 environ); solvants de constante diélectrique faible (inférieure à 30). Dans chacune de ces classes de solvants, les paramètres A_{193} et A_{225} sont reliés entre eux par des relations linéaires. Nous en avons conclu que si la valeur d'hélicité calculée à partir de ces deux paramètres diffère sensiblement on peut admettre la présence d'une structure organisée autre que l'hélice α.

CHAPITRE V

SENSIBILITE DES DIFFERENTES METHODES DE DETERMINATION DE STRUCTURE HELICOIDALE AUX VARIATIONS NON STRUCTURALES

Toutes les méthodes de détermination structurale des polypeptides et des protéines basées sur les données de la DOR font appel implicitement à un certain nombre d'hypoyhèses que nous allons examiner afin de déterminer à l'égard de laquelle elles sont le moins restrictives.

I) HYPOTHESES

a) absence de structures organisées autre que l'hélice α d'enroulement droit

L'étude de modèles a permis de déterminer de manière assez précise les effets Cotton responsables de la DOR de plusieurs structures polypeptidiques. Il n'apparait toutefois pas possible à ce stade de déterminer de manière quantitative le contenu hélicoïdal des polypeptides ou de protéines possédant trois structures: hélice α, chaîne β, pelote statistique par exemple, ou hélices α de deux sens de rotation. On admet donc généralement que la seule structure organisée présente est l'hélice α (d'enroulement droit dans la plupart des cas), et on limite l'interprétation à un pourcentage d'hélicité. Il est évident que cette valeur est dénuée de signification si des structures autres que l'hélice α droite et la pelote statistique sont présentes.

Lorsque la détermination hélicoïdale est basée sur la connaissance d'un seul paramètre rotatoire (rotation à la raie jaune du sodium, rotation à un extremum de la courbe de DOR) l'absence d'une structure organisée autre que l'hélice α doit être vérifiée indépendamment. Toutefois l'examen des spectres infra rouge (de même d'ailleurs que la DOR ou le DC dans l'ultra violet lointain) ne permet pas de détecter la présence de faibles quantités (de l'ordre de 10 à 20%) de structure β par exemple.

Lorsque la détermination structurale est basée sur la connaissance de deux paramètres rotatoires (rotations simultannées à 233 nm et à 198 nm, paramètres a_o et b_o de l'équation de Moffitt, paramètres A_{193} et A_{225} de l'équation de Drude à deux

termes), il existe en principe un moyen de vérification interne qui permet de mettre en évidence la présence d'une structure organisée autre que l'hélice α. Si le contenu hélicoïdal calculé à partir des deux paramètres diffère sensiblement, on peut en principe admettre la présence d'une telle structure. Nous verrons par la suite qu' une telle vérification est possible avec l'équation de Drude à deux termes, difficile avec l'équation de Moffitt.

b) absence d'effets Cotton extrinsèques

Pour déterminer le contenu α hélicoïdal des polypeptides et des protéines il faut admettre que la seule contribution à la rotation (ou du moins aux paramètres rotatoires) provient des effets Cotton associés aux chromophores peptidiques. Ceci implique donc,soit l'absence d'effets Cotton extrinsèques, soit la possibilité de retrancher leur contibution à la rotation. Si les effets Cotton extrinsèques associés aux chromophores aromatiques et situés dans la région spectrale comprise entre 250 nm et 300 nm sont facilement observables, des effets Cotton extrinsèques de ces mêmes groupes ou d'autres chromophores de chaînes latérales correspondant à des bandes d'absorption dans la région spectrale comprise entre 190 nm et 250 nm peuvent être masqués par les effets Cotton peptidiques. La présence insoupçonnée de tels effets Cotton faussera la détermination hélicoïdale.

c) insensibilité des paramètres rotatoires aux variations non structurales

L'hypothèse la plus importante dans toutes déterminations structurales des polypeptides et des protéines est l'absence de variations non structurales des paramètres des effets Cotton associés aux chromophores peptidiques, ou du moins l'absence d'une influence de ces variations sur les paramètres rotatoires utilisés. En effet la détermination α hélicoïdale est basée sur la comparaison de la valeur du paramètre rotatoire calculée aux valeurs des paramètres rotatoires de modèles α hélicoïdal et en pelote statistique. Le contenu hélicoïdal est obtenu par simple interpolation. Ceci implique évidemment que les forces rotatoires des effets Cotton contribuant aux paramètres rotatoires dépendent uniquement de la structure de la liaison peptidique et soient indépendantes de toutes variations non structurales. Or l'existence de telles variations est évidente.

Pour les homopolypeptides les variations non structurales se manifestent de trois manières différentes :

-) différents homopolypeptides ayant une structure identique peuvent avoir des DOR différentes (effets de chaînes latérales). Cet effet est apparent dans le tableau II où nous avons reporté les paramètres des effets Cotton de trois polypeptides α hélicoïdaux. Les paramètres : force rotatoire, mais également position et largeur de bande, varient de manière non négligeable d'un polypeptide à un autre.

-) les courbes de DOR d'un homopolypeptide de structure donnée peuvent être différentes dans différents solvants (effets de solvants). Nous avons vu des exemples de ces effets lorsque nous avons établi l'équation de Drude à deux termes.

-) Il peut exister des effets liés à la distribution des longueurs des régions structurées le long de la molécule. Pour des faibles longueurs, les forces rotatoires ne sont plus nécessairement des fonctions linéaires du nombre de résidus dans le segment. En fait des calculs théoriques indiquent que pour l'hélice α la rotation par résidu diminue de 20 % lorsque le nombre de résidus d'un segment α hélicoïdal diminue de 40 à 10 [44].

Pour les protéines globulaires les variations non structurales peuvent être beaucoup plus importantes que pour les homopolypeptides. Ces variations supplémentaires peuvent provenir, soit de différentes possibilités d'interactions entre chaînes latérales ou entre une chaîne latérale et un groupe peptidique, soit des degrés de solvatation différents de la molécule entrainant, par exemple, une constante diélectrique variable tout le long du squelette peptidique.

II) SENSIBILITE DES PARAMETRES ROTATOIRES AUX VARIATIONS NON STRUCTURALES

Il est concevable que les variations non structurales que nous venons de citer influent plus sur certains paramètres rotatoires que sur d'autres. Afin de déterminer leur sensibilité il est nécessaire de calculer la contribution des effets Cotton aux différents paramètres rotatoires et d'établir les relations reliant paramètres rotatoires et forces rotatoires.

Nous avons pris en considération les paramètres rotatoires suivants: $[m']_{589}$ rotation à la raie jaune du sodium $[m']_{233}$ et $[m']_{198}$, rotations aux extrema de la courbe de DOR de l'hélice α; A_{193} et A_{225} coefficients de l'équation de Drude à deux termes, de même que $(A_{193} - A_{225})$; a_o et b_o, coefficients de l'équation de Moffitt.

Nous avons choisi comme modèles de polypeptides α hélicoïdal et en pelote statistique l'acide poly-L-glutamique respectivement à pH 4,3 et pH 7,0. Les valeurs des paramètres des effets Cotton sont reportées dans les tableaux II et III.

a) Contribution des effets Cotton aux paramètres rotatoires.

La contribution des effets Cotton aux paramètres rotatoires $[m']_{589}$, $[m']_{233}$ et $[m']_{198}$ se calcule directement à partir de l'équation de Moscowitz (équation 53).

Pour déterminer la contribution des effets Cotton aux paramètres A_{193}, A_{225} et $(A_{193} - A_{225})$ nous avons calculé séparément la DOR de chaque effet Cotton dans la région spectrale comprise entre 280 nm et 600 nm, puis nous avons recherché les valeurs des paramètres A_{193} et A_{225} qui permettent d'obtenir la meilleure reproduction de la courbe de DOR.

Le même procédé permet en principe de calculer la contribution des effets Cotton aux paramètres a_o et b_o. Toutefois étant donné que des relations existent entre ces paramètres et A_{193} et A_{225} (équations (64) et (65)), nous avons calculé la contribution aux paramètres a_o et b_o à partir de la contribution de ces effets Cotton aux paramètres A_{193} et A_{225}.

Les valeurs que nous avons ainsi obtenues sont reportées dans les tableaux X et XI.

A partir des contributions des effets Cotton aux différents paramètres rotatoires nous avons déduit les relations qui existent entre paramètres rotatoires et forces rotatoires. Ces relations sont portées dans le tableau XII.

b) Sensibilité des différents paramètres rotatoires.

Les équations portées dans le tableau XII permettent de déterminer quantitativement la sensibilité des paramètres rotatoires aux variations non structurales des forces rotatoires. Nous définissons une quantité β_{ij} égale à la variation en % de la force rotatoire de l'effet Cotton centré en λ_i entrainant une variation d'hélicité de 1 % calculée à partir du paramètre rotatoire j. Plus β_{ij} est grand, moins le paramètre rotatoire j est sensible aux variations de la force rotatoire de l'effet Cotton centré en λ_i. Les valeurs de β_{ij} calculées pour un contenu hélicoïdal de 100 % lorsque l'effet Cotton centré en λ_i est associé à l'hélice α, et pour un contenu hélicoïdal de 0 % lorsque cet effet Cotton est associé à la pelote statistique sont reportées dans le tableau XIII. Ces valeurs sont les plus petites possibles et correspondent donc à une sensibilité maximum.

TABLEAU X

CONTRIBUTION DES EFFETS COTTON DE L'ACIDE POLY-L-GLUTAMIQUE (pH 4,3) AUX PARAMETRES ROTATOIRES

paramètres	192nm[a]	207nm[a]	224nm[a]	somme
$[m]_{589}$	+ 440	- 180	- 270	- 10
$[m]_{233}$	+ 8050	- 5030	-17600	-14600
$[m]_{198}$	+41700	+15500	+ 8370	+65600
A_{225}	- 40	- 370	- 1550	- 1960
A_{193}	+ 3730	- 960	- 40	+ 2730
$(A_{193} - A_{225})$	+ 3770	- 590	+ 1510	+ 4690
a_o	+ 3070	- 1220	- 1790	+ 60
b_o	- 540	+ 80	- 220	- 680

(a): les effets Cotton sont caractérisés par la position de leur centre.

TABLEAU XI

CONTRIBUTION DES EFFETS COTTON DE L'ACIDE POLY-L-GLUTAMIQUE (pH 7,0) AUX PARAMETRES ROTATOIRES

paramètres	198nm[a]	217nm[a]	235nm[a]	F[b]	somme
$[m']_{589}$	- 160	+ 30	- 2	+ 20	- 110
m'_{233}	- 3430	+ 1440	+ 70	+ 150	- 1770
$[m']_{198}$	- 1270	- 1330	+ 40	+ 280	- 2280
A_{225}	- 120	+ 110	- 20	- 150	- 180
A_{193}	- 1200	+ 70	+ 10	+ 390	- 730
$(A_{193} - A_{225})$	- 1080	- 40	+ 30	+ 540	- 5550
a_o	- 1130	+ 180	- 10	+ 160	- 800
b_o	+ 160	+ 10	- 40	- 80	+ 50

(a): les effets Cotton sont caractérisés par la position de leur centre

(b): contribution du fond de rotation $BQ^2/(\lambda^2 - Q^2) + C/\lambda^2$, Q étant fixé arbitrairement à 184 nm.

TABLEAU XII

RELATIONS ENTRE LES PARAMETRES ROTATOIRES ET LES FORCES ROTATOIRES DES EFFETS COTTON DE L'ACIDE POLY-L-GLUTAMIQUE

pH 4,3

m'_{589}	=	+ 0,107	R_{192}	+ 0,130	R_{206}	+ 0,154	R_{224}	
m'_{233}	=	+ 1,98	R_{192}	+ 3,59	R_{206}	+ 10,1	R_{224}	
m'_{198}	=	+ 10,2	R_{192}	- 11,1	R_{206}	- 4,79	R_{224}	
A_{225}	=	- 0,009	R_{192}	+ 0,267	R_{206}	+ 0,888	R_{224}	
A_{193}	=	+ 0,907	R_{192}	+ 0,687	R_{206}	+ 0,023	R_{224}	
$(A_{193} - A_{225})$	=	+ 0,926	R_{192}	+ 0,420	R_{206}	- 0,865	R_{224}	
a_o	=	+ 0,750	R_{192}	+ 0,871	R_{206}	+ 1,02	R_{224}	
b_o	=	+ 0,131	R_{192}	- 0,060	R_{206}	+ 0,123	R_{224}	

pH 7,0

m'_{589}	=	+ 0,116	R_{198}	+ 0,148	R_{217}	+ 0,174	R_{235}	+ 1,06	B	
m'_{233}	=	+ 2,43	R_{198}	+ 7,51	R_{217}	- 5,30	R_{235}	+ 7,93	B	
m'_{198}	=	+ 0,900	R_{198}	- 6,91	R_{217}	- 3,25	R_{235}	+ 14,8	B	
A_{225}	=	+ 00,082	R_{198}	+ 0,589	R_{217}	+ 1,60	R_{235}	- 7,94	B	
A_{193}	=	+ 0,851	R_{198}	+ 0,357	R_{217}	- 0,822	R_{235}	+ 20,3	B	
$(A_{193} - A_{225})$	=	+ 0,769	R_{198}	- 0,232	R_{217}	- 2,42	R_{235}	+ 28,2	B	
a_o	=	+ 0,798	R_{198}	+ 0,962	R_{217}	+ 1,13	R_{235}	+ 7,86	B	
b_o	=	- 0,109	R_{198}	+ 0,033	R_{217}	+ 0,344	R_{235}	- 4,00	B	

Les forces rotatoires R_i sont exprimées en 10^{-42} erg cm^3.

TABLEAU XIII

SENSIBILITE DES PARAMETRES ROTATOIRES ($\beta_{i,j}$) AUX VARIATIONS DES FORCES ROTATOIRES DES EFFTS COTTON DE L'ACIDE POLY-L-GLUTAMIQUE (pH 4,3 et 7)

paramètres	192nm	206 nm	224nm	198nm	217nm	235nm	F
m'_{589}	0,25	0,61	0,42	0,65	3,8	46	5
m'_{233}	1,6	2,5	0,73	3,7	8,9	190	85
m'_{198}	1,6	4,4	8,2	54	51	1700	240
A_{225}	48	4,8	1,2	15	16	89	12
A_{193}	0,93	3,6	87	2,9	50	340	9
$(A_{193} - A_{225})$	1,4	8,9	3,5	4,8	110	170	10
a_o	0,28	0,70	0,48	0,76	4,6	6	6
b_o	1,4	8,9	3,5	4,8	110	170	10

Un certain nombre de faits ressortent clairement de ce tableau :

-) Le paramètre rotatoire $[m']_{589}$ est très sensible aux variations non structurales de pratiquement tous les effets Cotton. Ceci se manifeste, pour une structure donnée, par des variations notables de la rotation à 589 nm en fonction du polypeptide et du solvant. Il n'est donc pas étonnant que l'utilisation de ce paramètre rotatoire en tant que paramètre structural ait souvent conduit à des résultats erronés et que son utilisation soit des plus restreintes.

-) Comme on pouvait s'y attendre les paramètres $[m']_{233}$ et A_{225} d'une part et $[m']_{198}$ et A_{193} d'autre part sont surtout sensibles aux variations non structurales des effets Cotton centrés respectivement à 224 nm et 193 nm. Bien que pour ces quatre paramètres la contribution de l'effet Cotton centré à 206 nm ne soit pas négligeable (voir tableau X) des variations non structurales de l'ordre de 15 à 20 % de la force rotatoire de cet effet Cotton n'entraîne pas d'erreur appréciable (inférieure à 5 %) sur la détermination d'hélicité effectuée à partir de ces paramètres.

-) Le paramètre $(A_{193} - A_{225})$ est moins sensible aux variations non structurales

1) de l'effet Cotton centré à 193 nm que ne l'est le paramètre A_{193},

2) de l'effet Cotton centré à 224 nm que ne l'est le paramètre A_{225}

3) de l'effet Cotton centré à 206 nm que ne le sont les deux paramètres A_{193} et A_{225}. Ceci explique nos observations pour ce paramètre rotatoire en fonction du solvant et de la nature de la chaîne latérale.

-) L'influence des variations non structurales sur le paramètre a_o est pratiquement identique à l'influence de ces variations sur le paramètre $[m']_{589}$. Il n'est donc pas étonnant que ce paramètre rotatoire soit très sensible à la nature du solvant et de la chaîne latérale et que de ce fait son utilisation en tant que paramètre structural soit rendue difficile.

-) Enfin l'influence des variations non structurales sur le paramètre b_o est identique à l'influence de ces altérations sur le paramètre $(A_{193} - A_{225})$.

Les différentes sensibilités des paramètres rotatoires expliquent pourquoi l'utilisation de l'équation de Moffitt ne permet pas ou du moins rarement, de mettre en évidence la présence d'une structure organisée autre que l'hélice α. Etant donné la très grande sensibilité du paramètre a_o aux variations non structu-

rales il est difficile d'interpréter comme telle une différence d'hélicité même notable calculée à partir des deux paramètres a_o et b_o. Les deux paramètres A_{193} et A_{225} de l'équation de Drude à deux termes sont suffisament peu sensibles aux variations non structurales pour qu'il nous ait été possible d'établir deux relations linéaires entre ces deux paramètres· l'une valable dans des solvants de constante diélectrique élevée l'autre valable dans des solvants de constante diélectrique faible. Si pour un polypeptide ou une protéine les paramètres A_{193} et A_{225} sont tels que ces relations ne soient pas vérifiées (et donc que le contenu hélicoïdal calculé à partir des deux paramètres diffère sensiblement) on peut conclure à l'existence d'une structure organisée autre qu' α hélicoïdale.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE L'ABSORPTION ET DE L'ACTIVITE OPTIQUE ASSOCIEES AUX CHROMOPHORES NON PEPTIDIQUES. APPLICATIONS AU FERRICYTOCHROME c DE COEUR DE CHEVAL

Nous avons vu que des renseignements concernant la structure secondaire des polypeptides et des protéines pouvaient être obtenus par l'étude de l'activité optique associée aux chromophores peptidiques. L'une des conditions nécessaire est que les paramètres rotatoires utilisés ne soient pas influencés par une activité optique associée à des chromophores non peptidiques. Or de nombreuses protéines possèdent une telle activité optique. C'est en particulier le cas de toutes les hémoprotéines, et de ce fait, la détermination de la structure secondaire est rendue délicate. Toutefois, l'existence d'une activité optique non peptidique ne présente pas uniquement des inconvénients. Au contraire, comme le montrent les résultats que nous décrivons pour le ferricytochrome c, de nombreux renseignements concernant en particulier la structure tetiaire peuvent être obtenus par l'étude de cette activité optique.

L'interprétation de ces résultats suppose connues les propriétés spectrales des groupes aromatiques et prosthétiques, ainsi que quelques propriétés générales des cytochromes que nous exposons tout d'abord.

CHAPITRE I

ABSORPTION ET ACTIVITE OPTIQUE DES GROUPES AROMATIQUES

I) ABSORPTION DES GROUPES AROMATIQUES

Sur la figure 11 nous avons reporté les spectres d'absorption de la tyrosine, du tryptophane et de la phénylalanine. A des longueurs d'onde supérieures à 200 nm les trois acides aminés présentent deux bandes d'absorption, l'une intense vers 210-220 nm, l'autre d'intensité plus faible vers 260-280 nm. Dans les trois cas ces deux bandes sont associées à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du chromophore aromatique.

L'absorption de la tyrosine dépend de l'état d'ionisation de la molécule, et sur la figure 12 nous avons reporté les spectres d'absorption à pH 6 (non ionisée) et à pH 13 (ionisation de l'hydrogène du groupe phénolique).

Les seuls acides aminés qui présentent des bandes d'absorption que l'on peut facilement différencier de celles gu groupe peptidique sont le tryptophane et la tyrosine. Des rensignements concernant la structure des protéines peuvent donc être obtenus par l'étude de l'absorption de ces deux composés dans la région spectrale comprise entre 240 et 300 nm, région où l'absorption des groupes peptidiques est négligeable.

a) ionisation de la tyrosine

L'existence d'une ionisation anormale des groupes tyrosyls de certaines protéines a été mise en évidence par Crammer et Neuberger [46]. Des nombreux travaux effectués depuis il apparait qu'un groupe tyrosyl peut s'ioniser, soit à un pH normal (pH 9-10), soit à un pH plus élevé mais sans dénaturation notable de la protéine, soit enfin à des pH très alcalins et ceci en présence d'une dénaturation concomitante de la protéine. Il est admis aujourd'hui que des pK d'ionisation anormalement élevés sont dus à la présence de groupes tyrosyls à l'intérieur de la molécule protéique, groupes qui ne sont pas en contact avec le solvant.

Une étude de titration spectrophotométrique permet de déterminer la position des groupes tyrosyls par rapport au solvant et donc d'obtenir un certain nombre de renseignements quant à la structure tertiaire de la protéine. C'est ainsi que comme on peut s'y attendre, le pK d'ionisation des groupes tyrosyls des protéines dénaturées par la guanidine ou l'urée est normal.

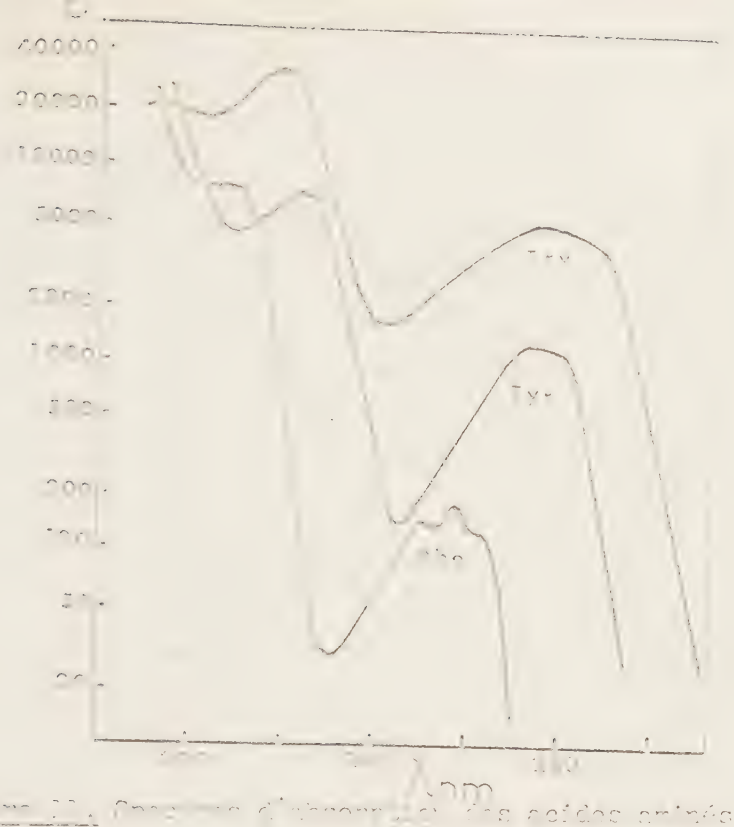


Figure 11. Spectres d'absorption des acides aminés aromatiques.

Figure 12. Spectres d'absorption de la tyrosine: [illegible] et pH 13.

b) Perturbation par le solvant

Il est observé expérimentalement que les bandes d'absorption des groupes tyrosyls et tryptophyls associées à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ subissent un déplacement vers le rouge lorsque l'indice de réfraction du solvant augmente. Ceci a conduit Herskovits et Laskowski [47] a développer une technique de perturbation par le solvant qui permet, par comparaison avec des modèles, de déterminer l'exposition au solvant des groupes aromatiques. En effet, si l'on augmente l'indice de réfraction du solvant sans changer la structure de la protéine, le déplacement vers le rouge de la bande d'absorption sera d'autant plus important que le nombre de groupes aromatiques en contact avec le solvant est élevé. Il suffit alors de comparer les variations d'absorption à celles de modèles (tyrosine-ethyl-ester, tryptophane-ethyl-ester) pour déterminer le nombre de groupes aromatiques en contact avec le solvant. En général le solvant est perturbé par addition de 10 à 20 % de glycol, d'éthylène glycol, de poly éthylène glycol ou de sucrose.

Les limites implicites dans cette technique de perturbation par le solvant sont :

1) la perturbation ne doit pas changer la conformation de la protéine.

2) la classification en groupes entièrement exposés et entièrement cachés est une approximation. En effet tous les états intermédiaires peuvent exister. Il est intéressant de noter à ce sujet que pour certaines protéines le déplacement vers le rouge de la bande d'absorption diminue lorsque la taille de la molécule perturbante augmente. Ceci indique l'existence de crevasses plus ou moins accessibles au perturbant.

c) Déplacement vers le bleu par dénaturation

Des produits tels que l'urée ou la guanidine, qui, à des concentrations élevées, provoquent la dénaturation des protéines, entrainent des variations d'absorption (déplacement vers le bleu) plus importantes que celles que nous venons de décrire. Ces variations sont dues au passage des groupes aromatiques de l'intérieur de la molécule protéique d'indice de réfraction élevé au solvant d'indice de réfraction en général beaucoup plus faible.

Ces différentes techniques, titration spectrophotométrique, perturbation par le solvant, déplacement vers le bleu par dénaturation sont des méthodes cou-

ramment utilisées aujourd'hui. Elles permettent d'obtenir des renseignements précieux concernant la structure tertiaire de la protéine étudiée.

Toutefois pour obtenir des renseignements quantitatifs concernant le nombre de groupes aromatiques accessibles ou non au solvant il est nécessaire d'effectuer toutes les mesures d'absorption en spectroscopie différentielle. Cette technique a été appliquée pour la première fois aux protéines par Laskowski et coll en 1956 [48].

En spectroscopie différentielle, le déplacement vers le rouge se traduit pour la tyrosyne par l'apparition d'un maximum vers 286-288 nm et d'un maximum d'intensité plus faible vers 278 nm, et pour le tryptophane par l'apparition de maximums à 292 nm et 284 nm. Inversement le déplacement vers le bleu se traduit par l'apparition de minimums localisés aux mêmeslongueurs d'onde environ.

La spectroscopie différentielle permet donc de distinguer l'exposition des groupes tyrosyls de l'exposition des groupes tryptophyls.

II) ACTIVITE OPTIQUE DES GROUPES AROMATIQUES

Des mesures de DOR et de DC ont révélé pour certaines protéines la présence entre 270 nm et 290 nm d'effets Cotton et de bandes dichroïques associés aux groupes tyrosyls et tryptophyls. Cette activité optique est très différente et beaucoup plus importante que celle des acides aminés L-tyrosine et L-tryptophane et disparait en général par dénaturation de la protéine.

Pour essayer de déterminer l'origine de cette activité optique, Fassman et coll. [49] et Beychook et Fassman [50] ont étudié la DOR et le DC du poly-L-tyrosine. Dans la région spectrale comprise entre 240 et 300 nm une activité optique très importante associée aux chromophores aromatiques s'ajoute à l'activité optique associée aux chromophores peptidiques. Par dénaturation du polypeptide la première tend à disparaitre et l'on pourrait penser qu'elle est induite par l'environnement asymétrique autour du groupe absorbant. Ceci serait en accord avec la théorie du champ asymétrique. Toutefois cette interprétation ne permet pas d'expliquer l'absence d'activité optique associée aux chromophores aromatiques dans des copolymères non séquencés α hélicoïdaux contenant moins de 20 % de groupes tyrosyls. Il faut donc admettre que l'une des conditions de l'activité optique est l'existence d'interactions entre groupes tyrosyls voisins.

Etant donné que la plupart des protéines possèdent moins de 10 % de groupes aromatiques distribués uniformément le long du squelette peptidique, il apparaitrait que les repliements de la chaîne (et donc la structure tertiaire), en permettant des interactions entre groupes aromatiques, jouent un rôle prépondérant dans la présence d'une activité optique associée à ces groupes. D'une manière générale on peut admettre, et c'est là pour l'instant le seul renseignement que l'on peut en tirer , que la présence d'une activité optique associée aux groupes aromatiques indique l'existence d'une structure compacte, et que sa disparition reflète un relachement de la structure tertiaire.

CHAPITRE II

PORPHYRINES ET METALLOPORPHYRINES

I) THEORIE DU CHAMP DE LIGANDS

Les orbitales des métaux de transition qui prennent part à la formation des liaisons de coordination avec des ligands sont les orbitales 3d, l'orbitale 4s et les trois orbitales 4p. Dans toutes discussions des propriétés de ces complexes la connaissance des 5 orbitales 3d est fondamentale.

La théorie du champ de ligandsconsidère le complexe métallique comme étant formé d'un ion positif central entouré d'un certain nombre de ligands, soit des anions (Cl^-, OH^-), soit des dipoles (H_2O, NH_3) dont la partie négative est dirigée vers l'ion central.

Les trois types de complexes les plus importants sont :

-) Les complexes tétracoordinés plans

-) Les complexes pentacoordinés pyramidaux obtenus par addition, perpendiculairement au plan précédent, d'un ligand supplémentaire ;

-) Les complexes hexacoordinés octaédriques obtenus par addition d'un sixième ligand du côté opposé de ce plan.

L'orientation des 5 orbitales 3d est représentée sur la figure 13.

En l'absence de ligands ces 5 orbitales sont dégénérées et possèdent donc la même énergie. Toutefois,par addition de ligands cette dégénérescence est levée d'une manière dépendant du type de complexe formé. La figure 14 indique les symétries et les multiplicités des différents niveaux obtenus en fonction de la symétrie du complexe.

Nous limiterons la suite de la discussion aux complexes hexacoordonés octaédriques.

Les 6 liaisons σ de coordination entre les ligands et l'ion métallique mettent en jeu l'orbitale $3d_{z^2}$, l'orbitale $3d_{x^2-y^2}$ l'orbitale 4s et les 3 orbitales 4p de l'ion central. Les trois orbitales d_{xy}, d_{yz} et d_{zx} (t_{2g}) ne prennent aucune part à la formation de ces liaisons (orbitales non liantes). Les orbitales $d_{x^2-y^2}$ et d_{z^2} (e_g) se combinent avec celles du ligand pour former des orbitales moléculaires e_g liantes et e_g^* anti liantes. Les liaisons σ de coordination se font

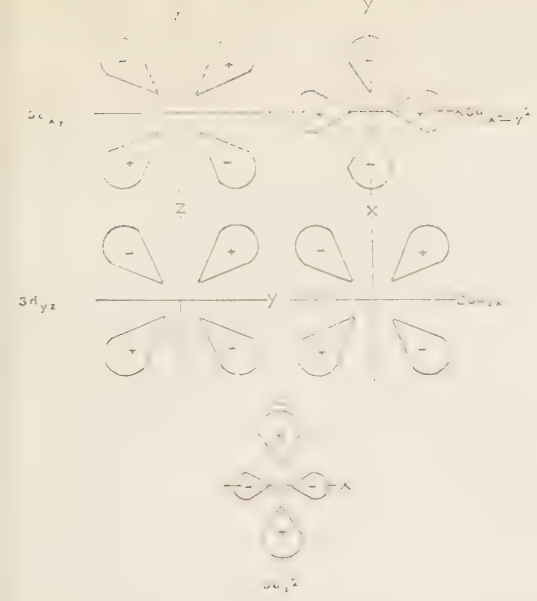


Figure 13. Orientation des orbitales 3d (référence 51)

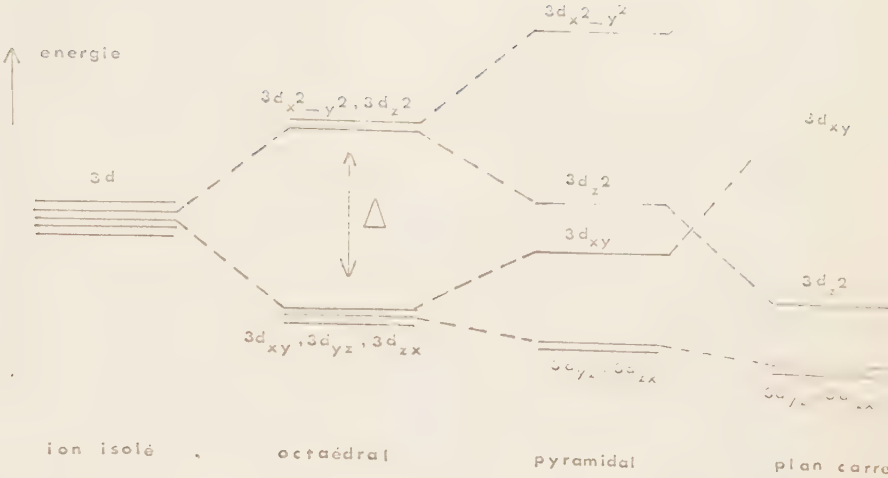


Figure 14. Energies des orbitales 3d (référence 51).

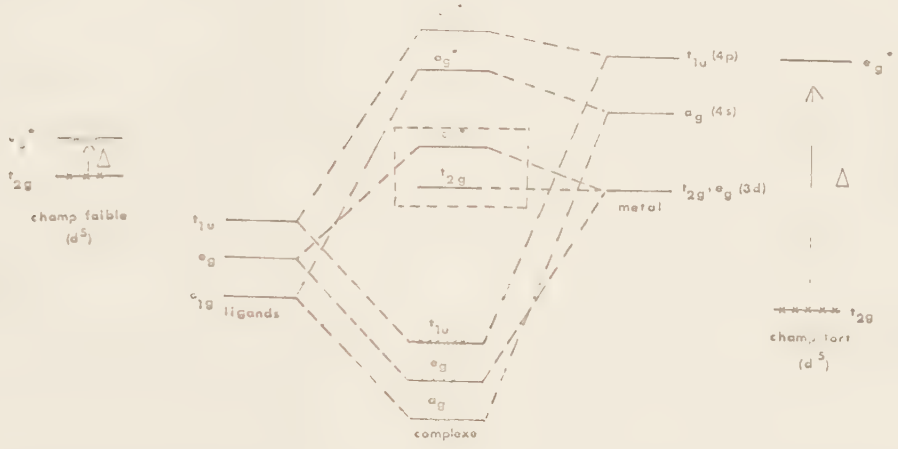


Figure 15. Orbitales moléculaires d'un complexe hexacoordiné (référence 52)

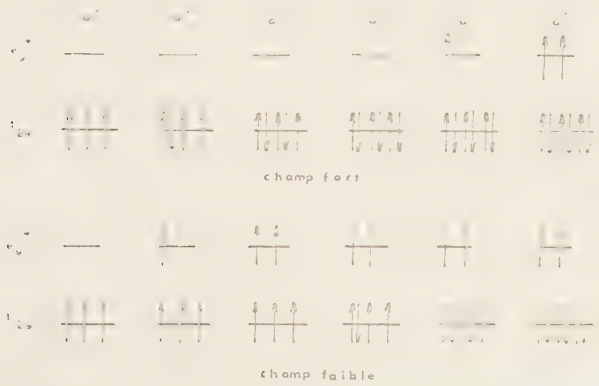


Figure 16. Répartition des électrons entre les orbitales t_{2g} et e_g^* (référence 52).

avec les orbitales t_{2g} non liantes et e_g^+ anti liantes (figure 15).

La théorie du champ de ligands est l'étude de la distribution des électrons d du métal entre les orbitales t_{2g} non liantes et e_g^+ anti liantes en fonction de l'énergie de séparation Δ de ces orbitales (figure 16). Cette énergie dépend de la charge du ligand et de la polarisabilité de l'ion métallique. Si l'ion central possède au plus 3 électrons 3d (d^1, d^2 ou d^3) ils vont occuper respectivement les orbitales d_{xy}, d_{yz} et d_{zx} leur spin parallèle. De même si l'ion central possède plus de 7 électrons 3d (d^8, d^9 ou d^{10}) une seule configuration électronique est possible pour l'état fondamental : trois paires d'électrons occupent les orbitales t_{2g}, 2 (d^8), 3 (d^9) ou 4 (d^{10}) électrons occupent les deux orbitales e_g^+ anti liantes. Toutefois si l'ion central possède de 4 à 7 électrons 3d (d^4, d^5, d^6 ou d^7) deux configurations électroniques sont possibles.

Si l'énergie de séparation Δ est grande par rapport à la répulsion de deux électrons appariés les 6 premiers électrons occuperont les 3 orbitales t_{2g} spins anti parallèles. Ces complexes sont appelés de champ élevé puisqu'ils ne se forment que si Δ (fonction du champ de ligands) est grand. De plus étant donné l'appariement maximum ces complexes sont de spins faibles. Un exemple typique en est le $Fe(CN)_6^{4-}$.

Si l'énergie de séparation Δ est faible par rapport à la répulsion de deux électrons appariés, les 4ème et 5ème électrons vont surmonter cette énergie et se placer dans les orbitales e_g^+ anti liantes, spins parallèles à ceux des 3 électrons situés dans les orbitales t_{2g}. Ces complexes sont appelés de champ faible puisqu'ils ne se forment que si Δ est faible. De plus ces complexes sont de spins élevés. Un exemple typique en est le $Fe(H_2O)_6$. Sur la figure 16 nous avons porté les différentes distributions électroniques pour les complexes de champ fort et de champ faible.

En résumé, les ligands qui produisent un champ faible ont tendance à former des complexes de spins élevés et inversement les ligands qui produisent un champ élevé des complexes de spins faibles.

Il est établi, que pour la plupart des ions métalliques la valeur de Δ augmente suivant le ligand dans l'ordre :

$I^- < Br^- < Cl^- < OH^- < RCOO^- < F^- < H_2O < SCN^- < NH_3 < NO_2 < CN^-$.

Une des applications de la théorie du champ de ligands aux hémoprotéines parait évidente. Etant donné qu'il existe 4 liaisons de coordination entre le fer et le noyau porphyrinique qui ne prennent aucune part aux réactions, c'est la nature

des 5ème et 6ème ligands qui détermineront le spin du complexe. Inversement la connaissance de ce spin permet souvent d'obtenir des renseignements quant à la nature de ces ligands. Parmi les nombreuses applications de la théorie, c'est la seule que nous retiendrons par la suite.

II) PORPHYRINES ET METALLOPORPHYRINES

a) Nomemclature

Les porphyrines dérivent de la porphyne (eux mêmes des tétrapyrroles) par substitution de 8 chaînes latérales aux 8 atomes d'hydrogène. Dans la plupart des cytochromes à l'exception de ceux du groupe a, on retrouve la protoporphyrine IX dont les substituants sont indiqués sur la figure 17.

La chélation des porphyrines par un ion métallique (chélate tétracoordiné entre le métal et les 4 atomes d'azote du noyau porphyrinique) conduit aux métalloporphyrines. Les chélates ion ferreux-protoporphyrine et ion ferrique-protoporphyrine sont appelés respectivement ferroprotoporphyrine et ferriprotoporphyrine (ou plus couramment ferro et ferrihème). La ferroprotoporphyrine est facilement oxydable en ferriprotoporphyrine. Cette dernière a une charge positive résiduelle neutralisée par un anion, en général le Cl^- (chlorohémine pentacoordinée). Des complexes hexacoordinés octoédriques se forment par coordination du fer en position 5 et 6 . Si les ligands 5 et 6 sont aminés les complexes formés sont appelés hémochromes (ion ferreux) et hémichromes (ion ferrique).

b) spectres d'absorption des porphyrines et des metalloporphyrines (fer)

Le spectres d'absorption électroniques des porphyrines et des metalloporphyrines sont caractérisés par un grand nombre de bandes d'absorption s'étendant de l'infra rouge proche à l'ultra violet lointain.

1) absorption dans le visible

Une des conséquences de la délocalisation des électrons π du noyau porphyrinique est que la différence d'énergie entre les orbitales occupées de niveaux les plus élevés et les orbitales libres de niveaux les moins élevés est relativement faible. De ce fait les transitions entre ces orbitales donnent lieu à des bandes d'absorption dans le visible.

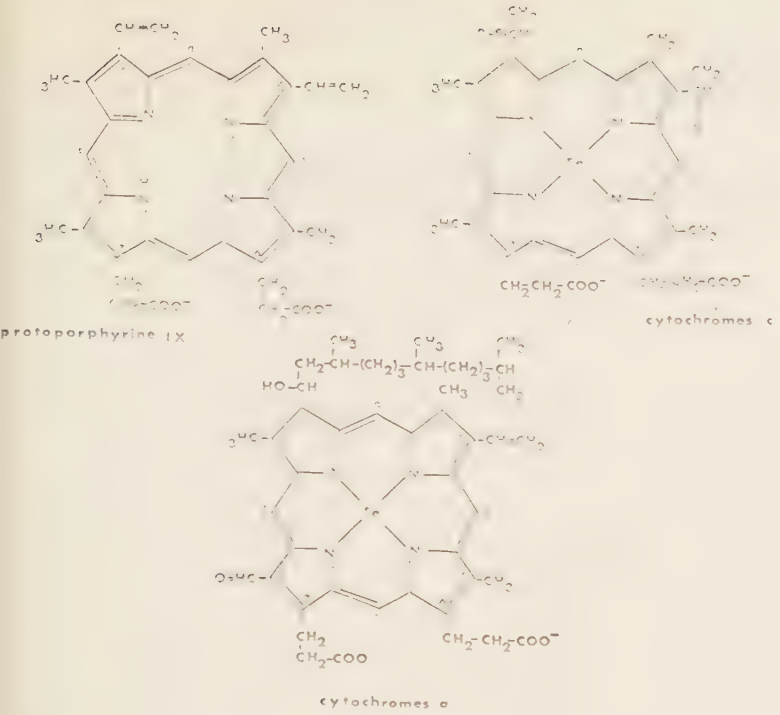


Figure 17. Porphyrine et métalloporphyrines.

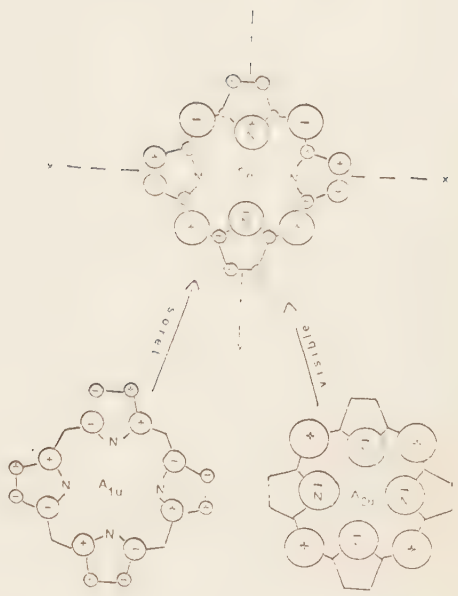


Figure 18. Transitions électroniques des porphyrines (référence 53).

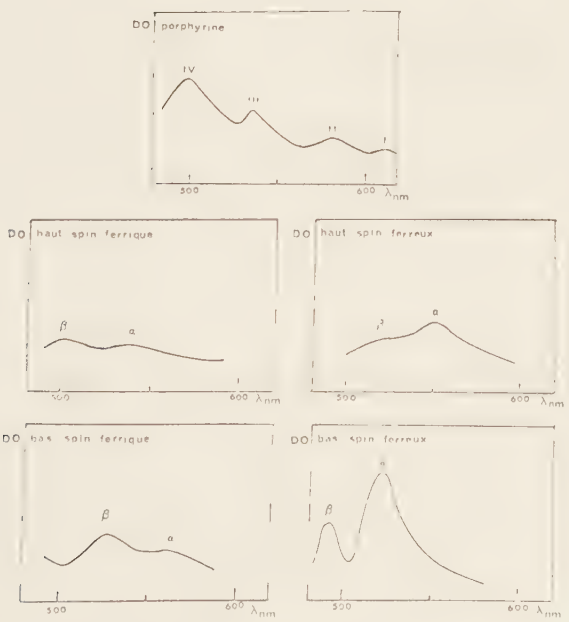


Figure 19. Absorption des porphyrines et métalloporphyrines dans le visible.

TABLEAU XIV

STRUCTURE PRIMAIRE DU CYTOCHROME c DE COEUR DE CHEVAL

Acétyl-Gly-Asp-Val-Glu-Lys-Gly-Lys-Lys-Ileu-Phe-Val-$GluNH_2$-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

HEME
Lys-Cys-Ala-$GluNH_2$-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys-Gly-Gly-Lys-His-
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

Lys-Thr-Gly-Pro-$AspNH_2$-Leu-His-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg-Lys-Thr-
27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

Gly-$GluNH_2$-Ala-Pro-Gly-Phe-Thr-Tyr-Thr-Asp-Ala-$AspNH_2$-Lys-
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53

$AspNH_2$-Lys-Gly-Ileu-Thr-Trp-Lys-Glu-Glu-Thr-Leu-Met-Glu-
54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66

Tyr-Leu-Glu-$AspNH_2$-Pro-Lys-Lys-Tyr-Ileu-Pro-Gly-Thr-Lys-Met-
67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Ileu-Phe-Ala-Gly Ileu-Lys-Lys-Lys-Thr-Glu-Arg-Glu-Asp-Leu-
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94

Ileu-Ala-Tyr-Leu-Lys-Lys-Ala-Thr-$AspNH_2$-GluCOOH
95 96 97 98 99 100 101 102 103 104

Le spectre d'absorption des porphyrines présente dans le visible 4 bandes dénommées I, II, III, IV dans l'ordre décroissant des longueurs d'onde. Il est en général admis que ces 4 bandes sont en réalité deux paires de bandes (I-III et II-IV) dont les composantes seraient superposées si le noyau porphyrinique était plan. La distortion de ce noyau entraine une différence d'énergie de l'ordre de 6 à 7 Kcal entre les deux bandes d'une même paire. Par complexion avec un ion métallique cette différence d'énergie disparait et seules deux bandes sont observées. Ces bandes dénommées α et β pour les metalloporphyrines correspondent respectivement aux paires de bandes I-III et II-IV.

Les bandes d'absorption dans le visible sont associées à des transitions entre les orbitales de type A_{2u} et des orbitales vides de type E_g (figure 18). Dans tous les cas ces transitions ont leur origine dans un déplacement d'électrons vers la périphérie, soit dans la direction de l'axe reliant deux atomes d'hydrogène situés sur deux atomes d'azote diamétralement opposés du noyau (bande III et IV) soit perpendiculairement à cette direction (bande I et II).

Nous avons porté sur la figure 19 les spectres d'absorption dans le visible d'une porphyrine, d'une ferroporphyrine (spin faible et spin élevé) et d'une ferriporphyrine (spin faible et spin élevé).

2) bande de Soret (γ)

Une bande d'absorption située vers 400 nm a été découverte en 1883 par Soret pour l'hémoglobine. Cette bande, la plus intense des porphyrines, existe pour tous les tétrapyrroles conjugués. Elle est associée à une transition d'un électron d'une orbitale de symétrie A_{1u} à une orbitale de symétrie E_g (figure 18).

3) autres bandes

Il existe de nombreuses autres bandes d'absorption associées à la porphyrine. Nous citerons la bande δ vers 350-360 nm, et une bande vers 280 nm.

De plus pour les ferricytochromes c de mammifères une bande d'absorption est observée à 695 nm.

L'étude en spectroscopie polarisée d'un cristal de ferricytochrome c semble indiquer que la transition associée à cette bande est polarisée perpendiculairement au plan porphyrinique [54]. Une telle polarisation pourrait s'expliquer entre autre par la promotion d'un électron d'une orbitale d'un ligand non porphyrinique (ligand en position 5 ou 6 du fer) à une orbitale des ligands porphyriniques. L'énergie relativement faible de cette transition indiquerait, soit que le ligand non porphyrinique est faiblement attaché au métal, soit qu'une paire d'électrons de ce ligand est faiblement liée comme dans le cas du soufre par exemple. Nous verrons

par la suite que cela a son importance.

c) activité optique

La protoporphyrine IX n'est pas optiquement active. Sa liaison à une protéine est capable d'induire une activité optique dans toutes ses bandes d'absorption. Ce phénomène s'explique facilement en terme d'environnement asymétrique. On connait d'ailleurs des complexes synthétiques d'un polypeptide ou d'un acide nucléique et d'un colorant présentant des effets Cotton extrinsèques [55-57].

Nous ne nous étendrons pas pour l'instant sur cette activité optique, puisque les résultats que nous présentons par ailleurs pour le ferricytochrome c illustrent l'origine de l'activité optique extrinsèque et les renseignements que l'on peut obtenir par son étude.

CHAPITRE III

QUELQUES PROPRIETES DES CYTOCHROMES c

Les hémoprotéines largement réparties dans la nature participent principalement aux réactions suivantes:

-) transport d'oxygène. C'est le cas des hémoglobines et des pigments qui leur sont reliés
-) réduction des péroxydes. C'est le cas des péroxydases.
-) transport d'électrons. C'est le cas des cytochromes.

Les cytochromes du groupe c diffèrent de la plupart des autres hémoprotéines par l'attachement covalent du groupe prosthétique à l'apoprotéine. Il existe donc pour les cytochromes c deux types de liaisons entre le groupe prosthétique et la chaîne polypeptidique: des liaisons covalentes et des liaisons de coordination.

Les travaux, depuis ceux de Hill et Keilin [58] (préparation de la porphyrine du cytochrome c par traitement à l'acide hydrochloré en présence de SO_2) à ceux de Paul [59] (séparation de l'hème par traitement beaucoup plus doux aux sels metalliques) ont permis de déterminer de manière exacte la nature de l'attachement covalent. Ce double attachement se fait par deux liaisons thio-ethers entre les atomes de soufre de deux groupes cystéinyls de l'apoprotéine et les atomes de soufre situés sur les carbones α des chaînes latérales vinyliques de la porphyrine.

Par contre, malgré les nombreux travaux entrepris, et s'il apparait certain qu'une des liaisons de coordination non porphyrinique se fait avec le groupe imidazole du résidu histidyl 13, la nature du groupe de la chaine polypeptidique formant la seconde liaison de coordination non porphyrinique avec le fer n'est toujours pas résolue de manière définitive. Les deux hypothèses admises jusqu'à récemment étaient, soit l'existence d'une liaison de coordination avec un groupe ϵ-aminé d'un résidu lysyl, soit l'existence d'une liaison de coordination avec un deuxième groupe imidazole d'un résidu histidyl [59-66]. Nous verrons par la suite que Harbury et coll. [67] ont suggéré la possibilité d'une liaison de coordination avec une méthionine et qu'un certain nombre de nos résultats militent en cette faveur.

Depuis 1961 un grand nombre de structures primaires de cytochromes c de différentes origines ont été établies.

La structure primaire du cytochrome c de coeur de cheval, qui est la protéine que nous étudions par la suite, a été déterminée par Margoliash et coll [68]. La séquence en est reporté dans le tableau XIV. Pour ne citer qu'un certain nombre de propriétés de cette séquence signalons:

-) que le cytochrome c est une protéine basique a prépondérance de groupes lysyls.

-) que les groupes hydrophobiques sont concentrés en des régions bien déterminées de la molécule. Ceci contraste avec la distribution des résidus hydrophyls qui ne présentent aucune concentration particulière.

-) que comme tous les cytochromes c d'origine vertébrés (à l'exception du cytochrome c de thon) le cytochrome c de coeur de cheval possède 104 acides aminés. La masse moléculaire calculée (hème compris) est de 12363.

-) que les groupes cystéinyls sont invariablement situés en position 14 et 17 et sont donc séparés par deux résidus.

CHAPITRE IV

ETUDE STRUCTURALE DU FERRICYTOCHROME c DE COEUR DE CHEVAL

I) ABSORPTION DU FERRICYTOCHROME c DANS LA REGION DES GROUPES AROMATIQUES

Nous avons vu que les mesures d'absorption dans la région des groupes aromatiques permettent d'obtenir des renseignements quant à l'exposition de ces groupes au solvant. Nous avons donc étudié les variations d'absorption du ferricytochrome c dans cette région en fonction du pH en la presence et en l'absence d'agents coordinants (cyanure) et dénaturants (guanidine) [69].

L'absorption du ferricytochrome c natif dans la région des groupes aromatiques est trop élevée (ε_{280} = 22000) pour être due uniquement aux quatre groupes tyrosyls et au seul groupe tryptophyl de la chaine polypeptidique. Nous avons mis en évidence l'absorption importante du groupe hème (ε_{280} = 8000) par l'étude d'un hémopeptide (undécapeptide) , dépourvu de groupes aromatiques, préparé suivant une méthode décrite par Margoliash et coll.[64]. La composition de l'hème undécapeptide que nous avons déterminée par une analyse d'acides aminés est compatible avec la séquence suivante autour de l'hème:

Val-Glu(NH_2)-Lys-Cys-Ala-Glu(NH_2)-Cys-His-Thr--Val-Glu

L'étude systématique de ce peptide dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées pour le ferricytochrome c nous a permis d'éliminer les variations d'absorption dues à l'hème. Toutes les valeurs que nous reportons correspondent uniquement aux valeurs d'absorption des groupes aromatiques.

Le spectre différentiel: ferricytochrome c coordiné par le cyanure - ferricytochrome c natif, présente un premier minimum à 290 nm ($\Delta\varepsilon_{290}$ = - 4200) et un deuxième minimum à 282-284 nm ($\Delta\varepsilon_{284}$ = - 3700) (figure 20). Ce spectre correspond à une exposition des groupes aromatiques au solvant et donc à un changement de conformation. Les positions et les grandeurs relatives des deux minimums indiquent une exposition simultanée des groupes tyrosyls et du groupe tryptophyl.

Le spectre différentiel: ferricytochrome c pH 11 - ferricytochrome c pH 7, présente deux minimums à 290 nm et 280 nm (figure 20). A pH 11 toutefois,les groupes

tyrosyls peuvent être ionisés. Ceci aurait comme conséquence une augmentation d' absorption. Les mesures effectuées à 242 nm, où seul le phénomène d'ionisation est apparent, indiquent que l'équivalent d'une tyrosine est ionisée. En tenant compte de cette ionisation on obtient un spectre différentiel pratiquement identique à celui du ferricytochrome c coordiné par le cyanure. Il est probable que le changement de conformation du à l'action du pH basique est le même que celui du à l'action coordinante du cyanure.

Pour déterminer le domaine de stabilité de cet état nous avons suivi l' exposition des groupes aromatiques au solvant en fonction du pH. L'action du pH basique se manifèste déjà à pH 9 par une exposition relativement faible de ces groupes (figure 20). De pH 11 à pH 12.5 les spectres différentiels par rapport au ferricytochrome c natif sont pratiquement identiques, compte tenu de la correction nécessaire due à l'ionisation croissante des groupes tyrosyls lorsque le pH s'élève. Ce n' est qu'au delà de pH 12,5 que le spectre différentel indique une exposition plus prononcée des groupes aromatiques au solvant.

Comme dans le cas du cyanure et du pH basique. le spectre différentiel· ferricytochrome c en présence de 4 M de guanidine - ferricytochrome c natif, présente deux minimums à 284 et 290 nm (figure 21). Toutefois, les valeurs plus négatives ($\Delta\varepsilon_{290}$ = - 5400, $\Delta\varepsilon_{284}$ = - 5000) sont caractéristiques d'une exposition plus prononcée des groupes aromatiques. Ceci est confirmé en ce qui concerne les groupes tyrosyls par le spectre différentiel· ferricytochrome c pH 11 en présence de 4 M de guanidine - ferricytochrome c pH 7 en présence de 4 M de guanidine, qui indique une titration de 3,6 tyrosines, contre une en l'absence de guanidine (figure 21).

Pour déterminer le nombre de groupes aromatiques exposés au solvant nous avons effectué des mesures de perturbation par le solvant (20 % d'éthylène glycol). Bien que le petit nombre de groupes aromatiques perturbés, ajouté à l'absorption importante du groupe hème rendent les expériences délicates, il est possible de montrer:

1) qu'à l'état natif le groupe tryptophyl est partiellement exposé au solvant
2) qu'en présence de cyanure ce groupe s'expose entièrement et les groupes tyrosyls partiellement
3) qu'en présence de guanidine tous les groupes aromatiques sont exposés au solvant.

De l'ensemble de ces résultats on peut conclure qu'en plus de l'état natif il existe deux niveaux d'exposition différents des groupes aromatiques: une exposition

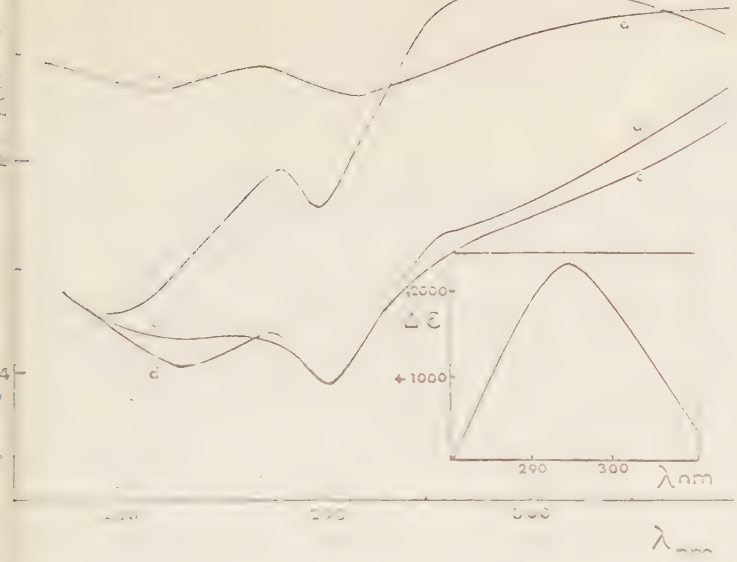


Figure 21. Spectres différentiels. a: ferricytochrome c pH 9 - ferricytochrome c pH 7; b: ferricytochrome c pH 11,5 - ferricytochrome c pH 7; c: courbe b corrigée pour l'ionisation d'une tyrosine; d: ferricytochrome c en présence de cyanure - ferricytochrome c pH 7. Cartouche: acétyl tyrosine éthyl ester pH 11 - acétyl tyrosine éthyl ester pH 7.

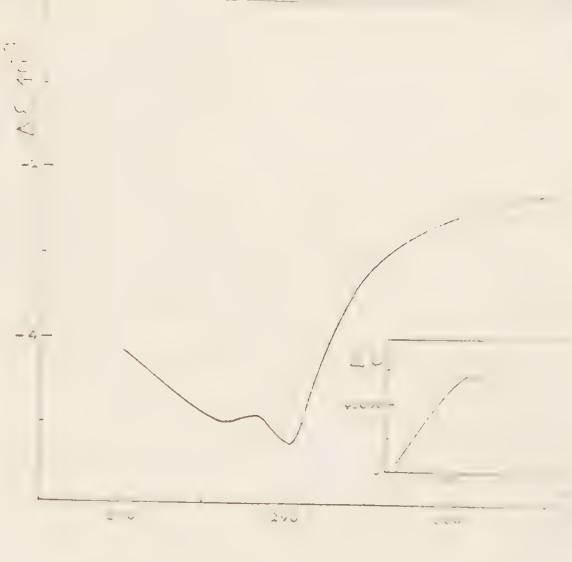


Figure 21. Spectres différentiels. Ferricytochrome c pH 7 en présence de 4 M de guanidine - ferricytochrome c pH 7. Cartouche: ferricytochrome c pH 11 en présence de 4 M de guanidine - ferricytochrome c pH 7 en présence de 4 M de guanidine.

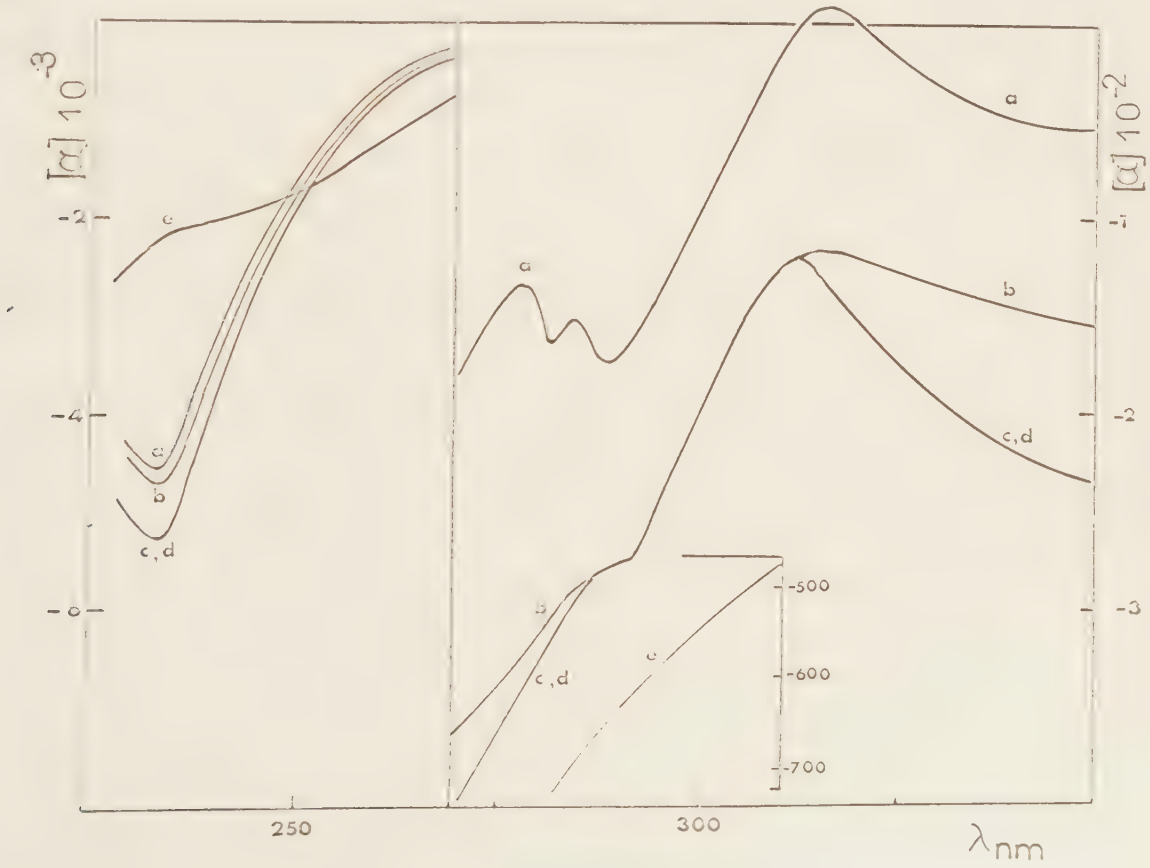


Figure 22. Dispersion optique rotatoire du ferricytochrome c. a: natif; b: en présence d'imidazole; c: en présence de cyanure; d: pH 11,5 ; e: en présence de 4 M de guanidine.

complète du groupe tryptophyl accompagnée d'une exposition partielle des groupes tyrosyls qui est obtenue par l'action du cyanure ou du pH basique entre pH 11,5 et 12,5; une exposition complète de tous les groupes aromatiques qui est obtenue par l'action de la guanidine. A ces deux niveaux d'exposition différents doivent correspondre deux conformations différentes.

L'effet qui accompagne la coordination du cyanure avec le groupe hème implique qu'une des liaisons de coordination, présente dans le ferricytochrome c natif, maintient la chaîne polypeptidique dans une position particulière dans laquelle les groupes aromatiques ne sont pratiquement pas en contact avec le solvant; sa destruction entraine une modification de la structure tertiaire qui permet une exposition partielle des groupes aromatiques au solvant. Une modification structurale de même nature permet d'expliquer l'exposition observée par l'action du pH basique.

L'exposition plus prononcée observée par l'action de la guanidine indique qu'à une modification de la structure tertiaire s'ajoute probablement une modification de la structure secondaire. Ceci est en accord avec l'effet dénaturant de la guanidine et est confirmé pour le ferricytochrome c par les mesures de DOR dans les régions d'absorption des groupes peptidiques que nous décrivons ci dessous.

Nous appellerons ces deux états caractérisés par une exposition partielle et par une exposition complète des groupes aromatiques respectivement: état intermédiaire et état dénaturé.

II) DOR DU FERRICYTOCHROME c ENTRE 220 nm ET 300 nm

La DOR du ferricitochrome c natif entre 220 nm et 300 nm est caractérisée par une multiplicité d'effets Cotton entre 270 nm et 300 nm (effets Cotton associés aux chromophores aromatiques), et par un minimum de rotation négatif à 233 nm ($[m']_{233}$ - 4500) (figure 22) [70]. Une telle valeur de $[m']_{233}$ indique, à condition que la contribution à la rotation du groupe hème ne soit pas trop importante, un contenu hélicoïdal faible de l'ordre de 20 à 30 %.

Par addition de cyanure ou d'imidazole (coordinants du groupe hème) ou par élévation de pH (de pH 7 à pH 11 - 12,5), la multiplicité d'effets Cotton entre 270 nm et 300 nm disparait, seul un épaulement subsiste, et la valeur absolue de $[m']_{233}$ augmente légèrement (figure 22). La simplification de la courbe de DOR entre 270 nm et 300 nm suggère un changement de l'environnement des groupes aromatiques, compatible avec l'exposition de ces groupes au solvant. L'augmentation relativement faible

de la grandeur de la rotation à 233 nm ($\Delta[m]_{233} = 300$) peut s'expliquer sans faire intervenir une augmentation d'hélicité si l'on admet que la contribution à la rotation du groupe hème varie. Nous verrons que les mesures de DC confirment ce point. La transition de l'état natif à l'état intermédiaire est donc accompagnée principalement par un changement de la structure tertiaire de la protéine.

En présence de 4 M de guanidine les effets Cotton associés aux chromophores aromatiques disparaissent entièrement et la grandeur de la rotation à 233 nm diminue sensiblement ($[m]_{233} = -1800$)(figure 22). Ceci confirme donc que la transition de l'état natif à l'état dénaturé implique, en plus du changement de structure tertiaire observé lors de la transition de l'état natif à l'état intermédiaire, un changement de structure secondaire accompagné d'une diminution notable d'hélicité.

III) ABSORPTION DU FERRICYTOCHROME c ET DE L'HEME UNDECAPEPTIDE DANS LES REGIONS D'ABSORPTION DU GROUPE PROSTHETIQUE

Il est bien établi que la bande d'absorption centrée à 695 nm et caractéristique uniquement des ferricytochromes c de mamifères, disparait aux pH basiques et acides [60] ou aux températures élevées [71], et sous l'action d'agents coordinants du groupe hème (cyanure [72], azide [73], imidazole [71]) ou d'agents dénaturants des protéines (urée, guanidine) [71]. Etant donné, d'une part qu'il était couramment admis que deux groupes aminés de la chaîne polypeptidique du ferricytochrome c natif formaient les liaisons de coordination non porphyriniques avec le fer, et d'autre part qu'il s'est avéré impossible de créer cette bande par addition de ligands aminés à d'autres hémoprotéines ou à des hémopeptides du ferricytochrome c, certains auteurs [71] ont conclu à une nature structurale de cette bande d'absorption. Or Harbury et coll. [67] ont montré récemment que des complexes: hémopeptides du cytochrome c - N-acétyl-DL-méthionine, présentent entre 500 nm et 600 nm toutes les caractéristiques d'hémichromes ou d'hémochromes (spins faibles). Des complexes mixtes méthionine et imidazole (la position de coordination 5 du fer est toujours occupée par le groupe imidazole du résidu histidyl 13) ont donc les mêmes propriétés hémochromogènes que les complexes dinitrogénés. Vers la même époque Ando et coll. [74,75] ont montré que la carboxyméthylation de la méthionine 80 entraine une perte totale de l'activité enzymatique. Il n'était donc pas exclu, que par l'intermédiaire du groupe thioéther, une méthionine joue un rôle fondamental dans la coordination des ferricytochromes c de mamifères.

Il nous a semblé donc nécessaire de reévaluer les relations entre absorption et conformation du ferricytochrome c. C'est dans ce but que nous avons étudié l'absorption du ferricytochrome c et de l'hème undécapeptide dans les régions d'absorption du groupe prosthétique, en particulier dans la bande d'absorption à 695 nm, dans la bande de Soret (370 - 430 nm) et dans la bande δ (350 -360 nm), cette dernière étant caractérisée par un épaulement. Nous avons en particulier comparé les absorptions du ferricytochrome c à l'état natif, intermédiaire et dénaturé aux absorptions du ferrihème undécapeptide coordiné par différents ligands aminés et par le N-acétyl-DL-méthionine [76].

Les résultats obtenus, reportés sur le tableau XV et sur les figures 23 et 24, indiquent clairement que les absorptions du ferricytochrome c à l'état intermédiaire (addition d'imidazole, augmentation du pH) et à l'état dénaturé (addition de guanidine) sont identiques à celles du ferrihème undécapeptide coordiné par des ligands aminés (histidine, imidazole, lysine). Dans tous les cas,la bande d'absorption à 695 nm est absente, le maximum de la bande d'absorption de la région de Soret (ε_{max} = 125.000) est situé à 406-407 nm, et le coefficient d'extinction maximum de la bande δ est égal à 22.000 - 23.000. Par contre une grande similitude existe entre les absorptions du ferricytochrome c natif et du ferrihème undécapeptide coordiné par la N-acétyl-DL-méthionine. C'est ainsi que la bande d'absorption à 695 nm est recrée, du moins partiellement, par addition de N-acétyl-DL-méthionine. De plus les absorptions de la bande de Soret (λ_{max} = 410 nm , ε_{max} = 106.000) et de la bande δ (λ_{max} = 28.000 -29.000) sont très voisines de celles du ferricytochrome c natif.

L'analyse de ces résultats semble donc indiquer que toutes les variations d'absorption des bandes du groupe hème observées par dénaturation du ferricytochrome c (disparition de la bande à 695 nm, déplacement vers le bleu et hyperchromicité de la bande de Soret, hypochromicité de la bande δ) peuvent s'expliquer par l'existence d'un complexe mixte (méthionine - imidazole) pour le ferricytochrome c natif et d'un complexe dinitrogéné pour les ferricytochromes c à l'état intermédiaireet à l'état dénaturé.

Nous concluons donc que ce sont les changements de ligands : complexe mixte (méthionine-imidazole) à complexes dinitrogénés, qui sont principalement responsables des variations d'absorption observées par dénaturation du ferricytochrome c dans les bandes du groupe hème. Ceci explique par ailleurs la similitude des absorptions de ces bandes pour les ferricytochromes c à l'état intermédiaire et à l'état dénaturé.

TABLEAU XV

ABSORPTIONS DU FERRICYTOCHROME c ET DU FERRIHEME UNDECAPEPTIDE

	région de Soret		région 360nm
	λ nm(max)	ε (max) 10^{-3}	ε (max) 10^{-3}
Ferricytochrome c			
état natif	410	106,1	28,5
état intermédiaire			
pH 11,0 à pH 12,5	406,5	125	22,5
pH 8,5 à pH 11,5 en présence de 1 M d'imidazole	406,5	125	22,5
état dénaturé			
pH 7 en présence de 4 M de guanidine	406,5	125	22,5
Ferrihème undécapeptide			
pH 7 en présence d'imidazole, d'histidine, de lysine ou de 8 M de guanidine	406,5	125	22,5
pH 7 en présence de 2,5 M de N-acétyl-DL-méthionine	410	106	28,5

Figure [illegible]. Spectres d'absorption du ferricytochrome c et du ferrihème un[illegible] [illegible] forme. a: ferricytochrome c à l'état intermédiaire (pH 7 en présence [illegible] pH [illegible]: ferricytochrome c à l'état [illegible] (en présence de guanidine); ferrih[illegible] [illegible] en présence d'imidazole, [illegible] ou de lysine. b: ferrihème undé[illegible] présence de 2.[illegible] de N-acétyl-[illegible]. c: ferricytochrome c à l'état na[illegible]

Figure [illegible]. Spectres d'absorption du ferricytochrome c et du ferrihème undécapeptide [illegible] région [illegible]-750 nm. a: ferricytochrome c [illegible] présence d'imidazole, [illegible]. ferrihème undécapeptide en présence d'imidazole [illegible] l'état polymérisé [illegible]: [illegible] hème [illegible] en présence de N-acétyl-[illegible] (0.05 M, [illegible]): [illegible] chrome [illegible] l'état natif.

Bien qu'un changement structural ait lieu entre ces deux états, les positions de coordination 5 et 6 du fer sont occupées par des groupes aminés.

IV) DOR DU FERRICYTOCHROME c ET DE L'HEMOPEPTIDE DANS LA REGION DE SORET

La protoporphyrine IX en solution n'est pas optiquement active. Toutefois, lorsque ce groupe prosthétique est associé à une apoprotéine (hémoprotéines) une activité optique peut être induite dans les bandes d'absorption de ce groupe. Si l'existence d'une telle activité optique complique l'interprétation des courbes de DOR ou de DC dues aux chromophores peptidiques, de nombreux renseignements concernant la structure tertiaire de la protéine peuvent être obtenus par l'étude des effets Cotton ou bande dichroïque extrinsèques. En effet l'activité optique induite est très sensible à l'environnement du groupe hème. Un exemple frappant en est l'activité optique observée pour la myoglobine et le ferricytochrome c natifs dans la région de Soret. Dans le premier cas, où seul une liaison de coordination attache l'hème à l'apoprotéine, la DOR de la région de Soret est relativement simple et est caractérisée par un effet Cotton positif [77, 78]. Dans le deuxième cas, où l'attachement se fait par deux liaisons de coordination et deux liaisons covalentes, nous verrons que la DOR dans la région de Soret est très complexe et est caractérisée par une superposition d'effets Cotton. Contrairement donc à l'absorption, l'activité optique induite dans les transitions du groupe hème dépend de la conformation de la protéine.

Des mesures effectuées par d'autres auteurs indiquaient déjà clairement que la DOR dans les régions d'absorption du groupe hème dépend des interactions entre ce groupe et la chaîne polypeptidique [79-84]. Toutefois, si l'état natif était bien caractérisé par la DOR dans les régions d'absorption du groupe hème, il n'en était pas de même des états intermédiaire et dénaturé. De plus la nature des interactions existant entre l'hème et la chaîne polypeptidique dans ces deux états n'était pas établie.

Nous avons donc étudié la DOR du ferricytochrome c dans les régions d'absorption du groupe hème et en particulier dans la région de Soret qui promettait, à raison d'ailleurs, d'être la plus intéressante. Nous présentons les résultats obtenus pour le ferricytochrome c et l'hème undécapeptide en fonction du pH en la présence et en l'absence d'agents coordinants et dénaturants [85].

a) DOR du ferricytochrome c

La DOR de la région de Soret du ferricytochrome c natif est caractérisée principalement par la superposition d'un effet Cotton positif et d'un effet Cotton négatif, ce dernier étant centré à une longueur d'onde légèrement supérieure. Cette superposition d'effets Cotton est responsable de la présence d'un maximum de rotation très accentué aux environs de 410 nm (figure 25).

Nous avons trouvé que la DOR de la région de Soret du ferricytochrome c à l'état intermédiaire, que ce soit entre pH 11 et pH 12,5 ou en présence d'imidazole à des pH moins élevés, est caractérisée par un effet Cotton positif dont l'amplitude $\Delta[M]$ est égale à 55.000 (figure 25).

La DOR du ferricytochrome c à l'état dénaturé est caractérisée par un effet Cotton positif dont l'amplitude $\Delta[M]$ est égale à 115.000 (figure 25).

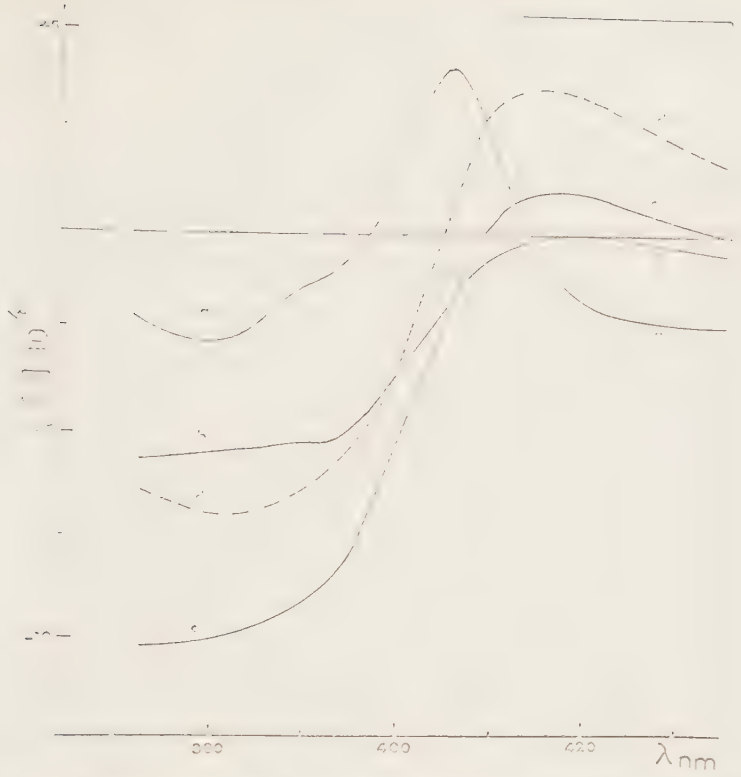
L'importante différence d'amplitude des effets Cotton du ferricytochrome c à l'état intermédiaire et à l'état dénaturé ne peut pas s'expliquer par une variation d'hélicité. Elle doit être une conséquence de différences d'interactions entre le groupe hème et la chaîne polypeptidique dans ces deux états.

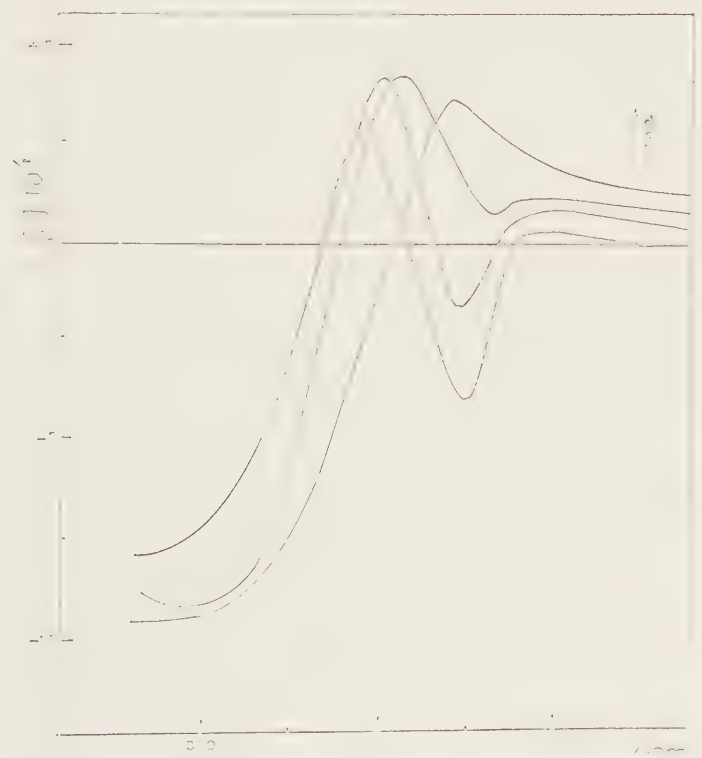
b) DOR de l'hème undécapeptide

Pour analyser la nature des interactions entre le groupe hème et la chaîne polypeptidique nous avons étudié la DOR d'un modèle simple du ferricytochrome c : le ferrihème undécapeptide dont la séquence est donnée en page 58.

L'hémopeptide en l'absence de ligands externes a tendance à polymériser [63-65]. Dans ces conditions nous avons trouvé que la DOR de la région de Soret est caractérisée par une superposition d'effets Cotton (figure 26). La forme des courbes de DOR dépend essentiellement du pH et de la concentration de l'hème undécapeptide. Par dilution, donc par dépolymérisation, la complexité de la région de Soret tend à disparaître. A la dilution la plus élevée ($2\ 10^{-6}$ M) les spectres d'absorption indiquent l'existence résiduelle de polymères et il ne nous a donc pas été possible de caractériser la DOR de l'hème undécapeptide monomère en l'absence de ligands externes. Toutefois les variations de la DOR en fonction de la dilution semblent indiquer qu'à la limite la DOR du monomère est voisine de celle du ferricytochrome c dénaturé.

En présence de ligands externes l'hémopeptide dépolymérise [63-65]. La DOR de l'hémopeptide coordiné, soit par l'imidazole, soit par la N-acetyl-DL-méthionine est caractérisée dans la région de Soret par un effet Cotton positif dont


λnm



l'amplitude $\Delta[M]$ est égale à 105.000. Un effet Cotton de même amplitude est obtenu en présence de grandes quantités (8 molaires) de guanidine ou d'urée.

c) Conclusions

Les conclusions que l'on peut tirer de cette étude de la DOR du ferricytochrome c et de l'hème undécapeptide sont les suivantes :

-) la DOR de la région de Soret est très sensible aux changements de la structure tertiaire de la protéine. Les trois états : natif (superposition d'effets Cotton) ; intermédiaire (effet Cotton positif d'amplitude 55.000) ; dénaturé (effet Cotton positif d'amplitude 115.000) ont des DOR bien caractéristiques.

La disparation de l'effet Cotton négatif réflète donc la transition de l'état natif à l'état intermédiaire, tandis qu'une augmentation de l'amplitude de l'effet Cotton positif reflète la transition de l'état intermédiaire à l'état dénaturé.

-) La comparaison de la DOR du ferricytochrome c dénaturé et de l'hème undécapeptide monomère suggère que le segment hémopeptidique détermine l'activité optique du ferricytochrome c dénaturé et non de ferricytochrome c natif comme certains auteurs l'ont suggéré [86]. La légère différence d'amplitude entre l'effet Cotton du ferricytochrome c dénaturé et de l'hème undécapeptide monomère (respectivement 115.000 et 105.000) de même que le déplacement négatif de l'effet Cotton du premier par rapport à l'effet Cotton du second, sont des conséquences de la contribution à la rotation de la chaîne polypeptidique, présente dans un cas, absente dans l'autre. Il apparait donc que les interactions entre le groupe hème et la chaîne polypeptidique du ferricytochrome c dénaturé sont limitées au segment peptidique présent dans l'hème undécapeptide.

-) Dans les conditions où l'état intermédiaire et l'état dénaturé sont observés pour le ferricytochrome c, seul un état est observé pour l'hème undécapeptide. On peut en conclure que les différentes amplitudes des effets Cotton du ferricytochrome c à l'état intermédiaire et à l'état dénaturé proviennent de l'existence à l'état intermédiaire d'interactions entre le groupe hème et la portion de la chaîne polypeptidique absente dans l'hème undécapeptide.

Il faut admettre que le remplacement d'une des liaisons de coordination du ferricytochrome c natif, soit par une liaison de coordination avec des ligands externes, soit par une liaison de coordination avec un autre groupe de la chaîne polypeptidique, n'entraine pas la perte complète d'interactions entre le groupe

hème et la portion de la chaîne polyeptidique absente dans l'hème undécapeptide. Toutefois, il est clair que ces interactions sont très différentes de celles présentes à l'état natif. Etant donné que la transition de l'état natif à l'état intermédiaire est accompagnée par l'ouverture de la crevasse fermée dans laquelle l'hème est situé [62], les interactions présentes à l'état natif et responsables de la grande complexité de la DOR doivent être reliées à l'existence de cette crevasse.

V) DICHROISME CIRCULAIRE DU FERRICYTOCHROME c

L'étude du DC du ferricytochrome c fait plus que confirmer les résultats obtenus par DOR. Elle permet de révéler des transitions optiquement actives qui ne sont pas détectées par DOR [87].

Le DC du ferricytochrome c natif est dominé dans la région spectrale comprise entre 350 nm et 450 nm par deux bandes dichroïques de forces rotatoires à peu près égales en valeur absolue mais de signes opposés : l'une négative centrée à 416 nm, l'autre positive centrée à 405 nm (figure 27). Toutefois nous observons également 2 épaulements à 435 nm (bande dichroïque négative) et à 390 nm (bande dichroïque positive) et un minimum vers 370-375 nm (bande dichroïque négative). Les deux bandes dichroïques de signes opposés centrées à 405 nm et 415 nm pourraient être associées à la bande de Soret dédoublée. Les deux bandes dichroïques centrées à 390 nm et 375 nm pourraient être associées à la bande d'absorption β également dédoublée dans ce cas. L'origine de l'épaulement à 435 nm est inexplicable. Il ne semble pas être dû à un artifact expérimental, mais pourrait être dû à la dissymétrie d'une bande d'absorption.

Les courbes de DC des ferricytochromes c à l'état intermédiaire et à l'état dénaturé sont dominées toutes deux par une bande dichroïque positive centrée à 405 nm (figure 27). La force rotatoire de la bande dichroïque du ferricytochrome c à l'état dénaturé est double environ de celle du ferricytochrome c à l'état intermédiaire. De plus les valeurs des ellipticités maximums sont compatibles avec les amplitudes des effets Cotton observés par DOR ($\Delta M = \frac{4}{11} |\theta|_{max}$ pour une bande dichroïque Gaussienne).

Il apparait donc que la transition de l'état natif à l'état intermédiaire est accompagnée dans la région de Soret principalement par la disparation de la bande dichroïque négative centrée à 416 nm, tandis que la transition de l'état

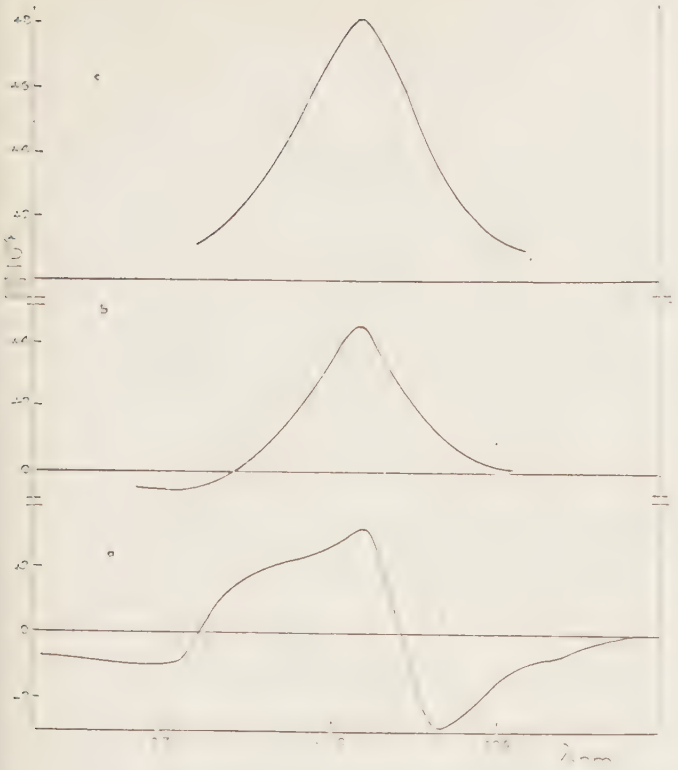


Figure 27. Dichroïsme circulaire du ferricytochrome c dans la région de Soret, à l'état natif; b: état intermédiaire; c: état réduit.

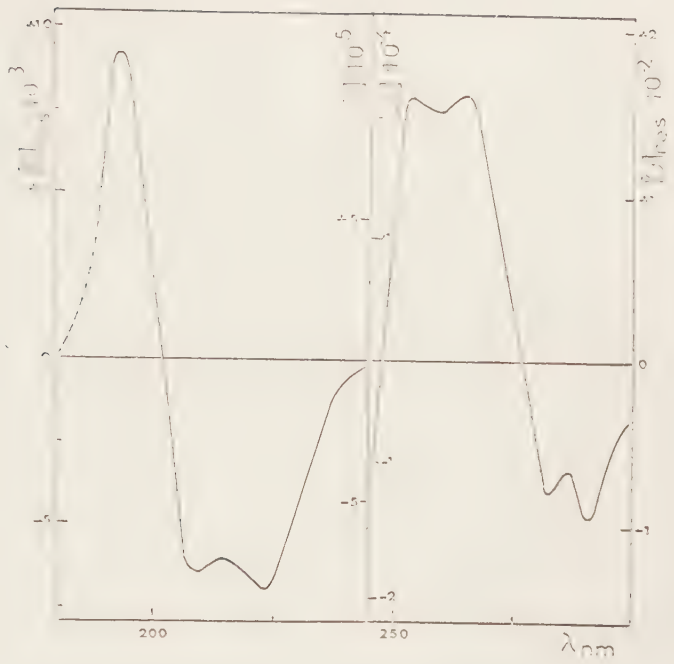


Figure 28. Dichroïsme circulaire du ferricytochrome c à l'état natif.

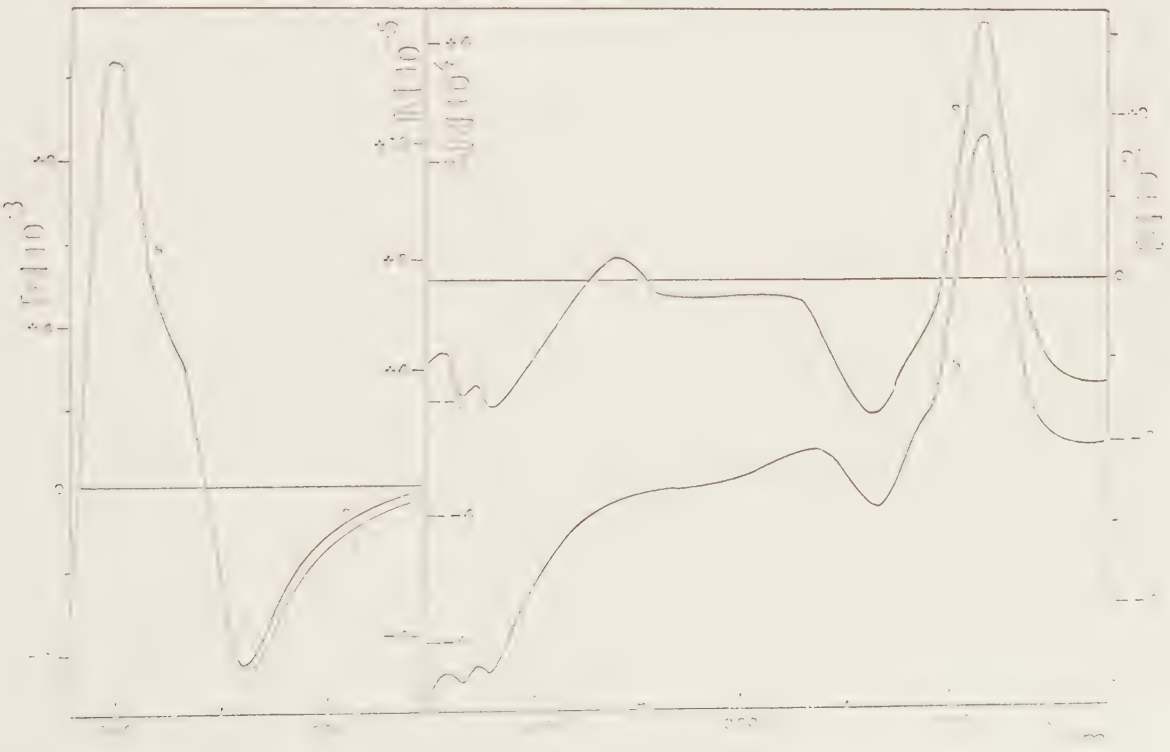


Figure 29. Dispersion optique rotatoire du ferricytochrome c à l'état natif. a: courbe expérimentale; b: courbe calculée à partir des données de dichroïsme circulaire en utilisant les relations de Krönig et Kram[illegible].

intermédiaire à l'état dénaturé est accompagnée par une augmentation de la force rotatoire de la bande dichroïque positive centrée à 405 nm. Ceci confirme bien l'interprétation des résultats obtenus par DOR.

La courbe de DC du ferricytochrome c natif entre 240 nm et 300 nm est caractérisée par deux bandes dichroïques négatives centrées à 288 nm et 282 nm et par deux bandes dichroïques positives centrées à 265 nm et 252 nm (figure 28). Les deux bandes dichroïques négatives, qui disparaissent d'ailleurs par dénaturation, sont associées aux chromophores aromatiques, et nous avions observé par DOR les effets Cotton correspondants. Par contre par DOR nous n'avions pas observé les deux effets Cotton positifs associés aux bandes dichroïques positives. Ceci provient du fait que ces effets Cotton sont situés dans un domaine de longueur d'onde où les rotations varient rapidement du fait de la proximité des effets Cotton associés aux chromophores peptidiques. Si l'une de ces bandes dichroïques, qui disparait par dénaturation, peut être associée au groupe prosthétique, l'autre pourrait être associée aux groupes cystéinyls de la chaine polypeptidique. En effet des effets Cotton associés à ces chromophores ont été observés dans cette région [88].

Enfin la courbe de DC du ferricytochrome c natif est caractérisée entre 185 nm et 240 nm par deux bandes dichroïques négatives centrées à 224 nm et 206 nm et une bande dichroïque positive centrée à 194 nm (figure 28). Si l'on s'en tient aux valeurs des ellipticitésdes extremums, le contenu hélicoïdal est relativement faible,de l'ordre de 20 à 30 %. Ceci est une valeur que nous avons également obtenue en utilisant en tant que paramètre rotatoire la rotation à 233 nm.

Nous avons recalculé la courbe de DOR en effectuant une transformation de Krönig - Krämers sur les données de DC entre 185 nm et 450 nm. Cette transformation nous a permis d'élucider un point resté obscur lors de l'étude de la DOR. Nous avons vu que lors de la transition de l'état natif à l'état intermédiairela grandeur de la rotation à 233 nm augmentait légèrement. Nous avons admis que ceci pouvait s'expliquer par des contributions différentes à la rotation du groupe hème. Ceci semblait vraissemblable si l'on tenait compte du fait que dans le domaine de longueur d'onde compris entre 450 nm et 270 nm les rotations du ferricytochrome c à l'état natif sont nettement plus positives que ce à quoi on devait s'attendre du fait de la rotation de la chaine polypeptidique, et ceci quelle que soit la structure secondaire. Par dénaturation ce fond de rotation positif disparait et il n'était donc pas exclu que ce soit cette disparition qui soit responsable de la variation de la rotation à 233 nm. Toutefois, il n'était pas possible de prévoir si ce fond de rotation provenait de

transitions optiquement actives situées dans la région d'absorption des groupes peptidiques ou de transitions optiquement actives situées en dessous de 190 nm. La transformation de la courbe de DC en courbe de DOR permet d'affirmer que le fond de rotation positif provient de transitions optiquement actives situées en dessous de 190 nm. En effet, si la courbe de DOR calculée reproduit bien tous les accidents de la courbe de DOR expérimentale, elle est décalée négativement par rapport à cette dernière (figure 29). Or si les transitions optiquement actives responsables du fond de rotation positif étaient situées dans la région spectrale 190 nm- 450 nm la courbe de DOR calculée devrait être identique à la courbe de DOR observée.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons présenté dans cette thèse les renseignements que l'on peut obtenir sur les structures secondaire et tertiaire des polypeptides et des protéines par l'étude de leur activité optique. Bien qu'il existe des théories élaborées qui permettent en principe de relier l'activité optique à la structure moléculaire, il est nécessaire pour les macromolécules complexes que sont les polypeptides et les protéines de faire appel à des procédés plus ou moins empiriques.

Pour la détermination de la structure secondaire le problème revient tout d'abord à déterminer l'activité optique de modèles de structure connue. Lorsque nous avons entrepris cette thèse, seules étaient établies les propriétés optiques des structures α hélicoïdale et en pelote statistique. Actuellement ces propriétes sont connues pour différentes configurations de chaîne β et pour les hélices de type poly-L-proline I et poly-L-proline II.

A partir de l'activité optique de modèles de structure connue, il devient possible en principe d'analyser la DOR ou le DC des polypeptides et des protéines en terme; de mélanges de ces structures. Il apparait toutefois qu'une telle analyse nécessite la connaissance de la sensibilité des différents paramètres structuraux utilisés à des variations non structurales qui peuvent être importantes (effet de solvant, effet de chaîne latérale, effet de distribution des régions structurées). Il est donc nécessaire de rechercher les paramètres structuraux les moins influencés par de telles variations en étudiant l'activité optique de nombreux modèles de structure connue dans des conditions très variées.

Le but final de l'étude de l'activité optique associée aux chromophores peptidiques est de pouvoir analyser les courbes de DOR ou de DC en terme: de structure secondaire, ou du moins en terme de pourcentage des différentes configurations présentes. Si une telle analyse est limitée pour l'instant à des mélanges de structures α hélicoïdale et en pelote statistique, il doit être possible dans un proche avenir de déterminer le contenu structural en terme: des trois structures secondaires les plus importantes: l'hélice α, la chaîne β, la pelote statistique.

Lorsque nous avons entrepris l'étude de l'activité optique associée aux chromophores peptidiques des polypeptides et des protéines en vue de la détermination de leur structure secondaire, les seules structures protéiques déterminées par rayons X étaient celles de la myoglobine [89] et de l'hémoglobine [90]. Pour ces deux protéines des segments α hélicoïdaux relativement grands sont apparents, et le contenu α hélicoïdal calculé par DOR ou DC est en bon accord avec celui obtenu par rayons X. Il apparaissait donc à ce stade que les polypeptides étaient de bons modèles pour la détermination de la structure secondaire des protéines. Toutefois récemment la structure du lysozyme a été déterminée par rayons X [91]. Contrairement à la myoglobine et à l'hémoglobine cette protéine ne possède pas de segments α hélicoïdaux importants. On observe tout au plus, disséminé le long du squelette, des des suites de groupes peptidiques formant des petits segments d'hélice α. Par contre le contenu hélicoïdal déterminé par DOR ou DC ne semble pas être négligeable. La définition de l'hélice α telle qu'elle est utilisée pour les polypeptides ne s'applique donc pas au lysozyme.

Il existe un autre moyen de définir une hélice α ou toute autre configuration ordonnée: la configuration d'un groupe peptidique peut être définie par la valeur des deux angles dièdres φ et ψ correspondant à des rotations autour des liaisons N - C^{α} et C^{α} - C'. Pour l'hélice α ces valeurs ont été déterminées par différents auteurs [92-94]. Si l'on accepte cette définition comme critère d'hélicité α, il arrive qu'un groupe peptidique sans être engagé dans une hélice α possède des angles φ et ψ compatibles avec une telle structure. C'est le cas d'une vingtaine de groupes peptidiques du lysozyme. Ceci soulève un certain nombre de problèmes que nous allons simplement énumérer sans prétendre y apporter des réponses.

-) quelle est l'activité optique d'un groupe peptidique qui sans être engagé dans une hélice α possède des angles φ et ψ compatibles avec une telle structure ? Schellman et Nielsen [95] ont récemment entrepris l'étude préliminaire de l'activité optique de modèles dipeptidiques dont les angles φ et ψ sont fixes, et ces auteurs devraient apporter dans un proche avenir une réponse à cette question.

-) Quels renseignements tirer de la connaissance de la structure secondaire telle qu'elle est déterminée par DOR ou DC ?

Pour des protéines telles que la myoglobine et l'hémoglobine l'interprétation

du contenu hélicoïdal obtenu par DOR ou DC ne pose pas de problèmes puisqu'elle possèdent des segments α hélicoïdaux relativement importants. Par contre il apparait difficile d'interpréter le contenu hélicoïdal d'une protéine comme le lysozyme. Il semble que pour de telles protéines il faille surtout s'attacher à déterminer la structure tertiaire, c'est à dire les repliements de la chaîne peptidique. C'est ce que nous avons essayé de faire dans le cas d'une protéine particulière: le ferricytochrome c de coeur de cheval.

Dans une deuxième partie de la thèse nous avons analysé, dans le cas particulier du ferricytochrome c de coeur de cheval, les renseignements que l'on peut obtenir sur la structure tertiaire des protéines par l'étude de l'activité optique associée aux chromophores non peptidiques. Des résultats que nous avons présentés, il apparait que des renseignements précieux peuvent être obtenus par une telle étude. Il faut signaler toutefois, qu'un grand nombre de protéines ne présentent pas d'activité optique autre que celle associée aux chromophores peptidiques. Pour ces protéines il devrait être possible de former des complexes avec des composés absorbant dans le visible ou le proche ultra violet. L'environnement asymétrique autour de ces composés, et donc l'activité optique extrinsèque, dépendra de la structure tertiaire de la protéine qui peut être étudiée de cette manière.

REFERENCES

(1) Pour une description détaillée des origines et des premières théories de l'activité optique, voir: T.M. Lowry, "Optical Rotatory Power" (Editeurs: Longmans, Green & Co. Londres, 1935. Réédité par Dover, New-York, 1964).

(2) L. Pasteur, Oeuvres complètes Tome I, "Dissymétrie Moléculaire" (Editeur: Masson, Paris, 1922). a: p. 79 b: p. 329; c: p. 332.

(3) Pour une description de ces modèles, voir: W. Kauzmann, "Quantum Chemistry", (Editeur: Academic Press, New-York, 1957).

(4) L. Rosenfeld, Z. Physik, 52, 161, (1928).

(5) E.U.Condon, Revs. Mod. Phys., 9, 432, (1937).

(6) J.G. Kirkwood, J. Chem. Phys., 5 479, (1937).

(7) E.U. Condon, W. Altar et H. Eyring, J. Chem. Phys., 5, 753, (1937).

(8) Pour des références aux transformations de Krönig et Krämers voir l'article de A. Moscowitz dans "Optical Rotatory Dispersion" de C. Djerassi (Editeur: Mc Graw-Hill, New-York, 1960).

(9) W. Moffitt et A. Moscowitz, J. Chem. Phys., 30, 648, (1959).

(10) H.D. Hunt et W.T. Simpson, J. Am. Chem. Soc., 75, 4540, (1953).

(11) J.S. Ham et J.R. Platt, J. Chem. Phys., 20, 335, (1952).

(12) D.L. Peterson et W.T. Simpson, J. Am. Chem. Soc., 77, 3929, (1955).

(13) W. Moffitt, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 42, 736, (1956).

(14) K. Imahori et I. Tinaka, J. Mol. Biol., 1, 359, (1959).

(15) K. Rosenheck et P. Doty, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 47, 1775, (1961).

(16) W.B. Gratzer, G.M. Holzwarth et P. Doty, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 47, 1785, (1961).

(17) A.N. Grazer et K. Rosenheck, J. Biol. Chem., 237,3674, (1962).

(18) J.A. Schellman et P. Oriel, J. Chem. Phys., 37, 2114, (1962).

(19) C. Cohen et A.G. Szent-Gyorgyi, J. Am. Chem. Soc., 79, 248, (1957).

(20) C. Schellman et J.A. Schellman, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, série Chim., 30, 463, (1958).

(21) J.A. Schellman, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, série Chim., 30, 363, (1958).

(22) W. Moffitt, J. Chem. Phys., 25, 467, (1956).

(23) W. Moffitt et J.T. Yang, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 42, 596, (1956).

(24) W. Moffitt, D.D. Fitts et J.G. Kirkwood, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 43, 723, (1957).

(25) N.S. Simmons, C. Cohen, A.G. Szent-Gyorgyi, D.B. Wetlaufer et E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc. 83, 4766, (1961)

(26) E.R. Blout, I. Schmier et N.S. Simmons, J. Am. Chem. Soc., 84, 3193, (1962).

(27) J.P. Carver, E. Shechter et E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc., 88, 2550, (1966).

(28) E.R. Blout et E. Shechter, Biopolymers, 1, 565, (1963).

(29) P.K. Sarkar et P. Doty, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 55, 981, (1966).

(30) R. Townend, T.F. Kumisinski et S.N. Timascheff, Biochem. Biophys. Res. Comm., 23, 163, (1966).

(31) B. Davidson, N. Tooney et G.D. Fassman, Biochem. Biophys. Res. Comm., 23, 156, (1966).

(32) E. Iizuka et J.T. Yang, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 55, 1175, (1966).

(33) E.S. Pysh, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 56 825, (1966).

(34) E.R. Blout, J.P. Carver et J. Gross, J. Am. Chem. Soc., 85 644, (1963).

(35) F.A. Bovey et F.D. Hood, J. Am. Chem. Soc., 88, 2326, (1966).

(36) E.S. Pysh, J. Mol. Biol., 23, 587, (1967).

(37) J. Brahms et G. Spach, Nature, 200, 72, (1963).

(38) M. Legrand et R. Viennet, Comptes Rendus, 259, 4277, (1964).

(39) G. Holzwarth et P. Doty, J. Am. Chem. Soc., 87, 218 (1965).

(40) E. Shechter et E.R. Blout, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 51, 695, (1964).

(41) E. Shechter et E.R. Blout, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 51, 794, (1964).

(42) E. Shechter, J.P. Carver et E.R. Blout, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 51, 1029, (1964).

(43) P. Urnes et P. Doty, Adv. Prot. Chem., 16, 401, (1961).

(44) I. Tinoco Jr., R.W. Woody et D.F. Bradley, J. Am. Chem. Soc., 85, 1317, (1963).

(45) J.P. Carver, E. Shechter et E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc., 88, 2562, (1966).

(46) J.L. Crammer et A. Neuberger, Biochem. J., 37, 302, (1943).

(47) T.T. Herskovits et M. Laskowski Jr., J. Biol. Chem., 237, 2481, (1962).

(48) M. Laskowski Jr., J.M. Widom, M.L. McFadden et H.A. Scheraga, Biochem. Biophys. Acta, 19, 581, (1956).

(49) G.D. Fassman, E. Bodenheimer et C. Lindblow, Biochem., 3, 1665, (1964).

(50) S. Beychock et G.D. Fassman, Biochem., 3, 1675, (1964).

(51) L.E. Orgel dans "Haematin Enzymes" de J.A. Falk, R. Lemberg et R.K. Morton, (Editeur : Pergamon Press, New-York, 1961).

(52) H.H. Jaffee et M. Orchin "Theory and applications of ultra violet spectroscopy", (Editeurs : J. Wiley & Sons, New-York, 1962).

(53) J.E. Falk, "Porphyrins and metalloporphyrins", (Editeur : Elsevier, Amsterdam, (1964).

(54) W.A. Eaton et R.M. Hochstrasser dans "Hemes and Hemoproteins" de B. Chance, E. Eastabrook et T. Yonetani, (Editeur : Academic Press, New-York, 1966).

(55) E.R. Blout et L. Stryer, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 45, 1591, (1959).

(56) L. Stryer et E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc., 83, 1411, (1961).

(57) B.J. Gardner et F. Mason, Biopolymers, 5, 79, (1967).

(58) R. Hill et D. Keilin, Proc. Roy. Soc. Londres, B 107 286, (1930).

(59) K.G. Paul, Acta Chem. Scand., 5, 389, (1951).

(60) H. Theorell et A. Akesson, J. Am. Chem. Soc., 63, 1804, (1941).

(61) S. Pauelus, Acta Chem. Scand., 9, 335, (1955).

(62) P. George et R.L.J. Lyster, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 44, 1013, (1958).

(63) A. Ehrenberg et H. Theorell, Acta Chem. Scand., 9, 1193, (1955).

(64) E. Margoliash, N. Frohwirt et E. Wiener, Biochem. J., 71, 559, (1959).

(65) H. A. Harbury et P.A. Loach, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 45, 1344, (1959).

(66) E. Margoliash et A. Schejter, Adv. Prot. Chem., 21, 113, (1966).

(67) H.A. Harbury, J.R. Cronin, M.W. Fanger, T.P. Hettinger, A.J. Murphy, Y.P. Myer et S.N. Vinogradov, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 54, 1658, (1965).

(68) E. Margoliash, E.L. Smith, G. Kreil et G. Tuppy, Nature, 192, 1125, (1961).

(69) E. Shechter et P. Saludjian, Comptes Rendu, 261, 5689, (1965).

(70) E. Shechter et P. Saludjian, Comptes Rendu, D262, 193, (1966).

(71) A. Schejter et P. George, Biochem. 3, 1045, (1964).

(72) B.L. Horecker et A. Kornberg, J.Biol. Chem., 165, 11, (1946).

(73) B.L. Horecker et J.N. Stannard, J. Biol. Chem., 172, 586, (1948).

(74) K. Ando, M. Matsubara et K. Okunuki, Biochem. Biophys. Acta., 118, 240, (1966).

(75) K. Ando, M. Matsubara et K. Okunuki, Biochem. Biophys. Acta , 118, 256, (1966).

(76) E. Shechter et P. Saludjian, Biopolymers, (1967), sous presse.

(77) S. Beychock et E.R. Blout, J. Mol. Biol., 3, 769, (1961).

(78) T. Urnes, K. Imahori et P. Doty, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 47, 1635, (1961).

(79) D.D. Ulmer, Biochem., 4, 902, (1965).

(80) D.W. Urry et P. Doty, J. Am. Chem. Soc., 87, 2756, (1965).

(81) D.W. Urry, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 54, 640, (1965).

(82) Y.P. Myer et H.A. Harbury, Proc. Natl. Acad.Sci. (US), 54, 1391, (1965).

(83) R. Mirsky et P. George, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 56, 222, (1966).

(84) Y.P. Myer, A.J. Murphy et H.A. Harbury, J. Biol. Chem., 241, 5370, (1966).

(85) P. Saludjian et E. Shechter, Biopolymers, 5, 561, (1967).

(86) D.D. Ulmer, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 55, 894, (1966).

(87) E. Shechter et P. Saludjian, Comptes Rendu, C 264, 1501, (1967).

(88) D.L. Coleman et E.R. Blout dans "Conformation of biopolymers" de G.N. Ramachandran, (Editeur: Academic Press, New-York, 1967).

(89) J.C. Kendrew, R.E. Dickerson, B.E. Strandberg, R.G. Hart, D.R. Davies, D.C. Phillips et V.C. Shore, Nature, 185, 422, (1960).

(90) M.F. Perutz, M.G. Rossmann, A.F. Cullis, H. Muirhead, G. Will et A.C.T. North, Nature, 185, 416, (1960).

(91) D.C. Phillips, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 57, 484, (1967).

(92) P. De Santos, E. Giglio, A.M. Liquori et A. Ripamonti, Nature, 206, 456, (1965)

(93) S. Arnott et A.J. Wanacott, J. Mol. Biol. 21, 371, (1966).

(94) J.T. Edsall, P.J. Flory, J.C. Kendrew, A.M. Liquori, G. Nemethy, G.N. Ramachandran et H.A. Scheraga, J. Mol. Biol., 15, 399, (1966).

(95) J.A. Schellman et E.B. Nielsen, dans "Conformation of biopolymers" de G.N. Ramachandran (Editeur: Academic Press, New-York, 1967).

APPENDICE

(1) E.R. Blout et E. Shechter, Biopolymers, 1, 565, (1963).

(2) E. Shechter et E.R. Blout, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 51, 695, (1964).

(3) E. Shechter et E.R. Blout, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 51, 794, (1964).

(4) E. Shechter, J.P. Carver et E.R. Blout, Proc. Natl. Acad. Sci. (US), 51, 1029, (1964).

(5) J.P. Carver, E. Shechter et E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc., 88, 2550, (1966).

(6) J.P. Carver, E. Shechter et E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc., 88, 2562, (1966).

(7) E. Shechter et P. Saludjian, Comptes Rendu, 261, 5689, (1965).

(8) E. Shechter et P. Saludjian, Comptes Rendu, 262, 193, (1966).

(9) E. Shechter et P. Saludjian, Biopolymers, (1967), sous presse.

(10) P. Saludjian et E. Shechter, Biopolymers, 5, 561, (1967).

(11) E. Shechter et P. Saludjian, Comptes Rendu, C264, 1501, (1967).